

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA**

**Selección y caracterización de levaduras autóctonas
aisladas de "cachina" del distrito de Lunahuaná**

TESIS

para optar al título profesional de Biólogo con Mención en Microbiología y
Parasitología

AUTORA

Melina Yuriana Huamán Romero

ASESOR

Elena Quillama Polo

Lima – Perú

2010

DEDICATORIA

A Dios por derramarme su bendición divina y por regalarme cada día
junto a mis seres queridos. Gracias por siempre.

A mi padre Rolando Huamán por sus ejemplos de fe, fortaleza y
perseverancia, valores que dejó a quienes tuvimos la dicha de tenerlo
cerca.

A mi madre Gladys Romero, por su gran amor y el apoyo incondicional de todos
los días.

AGRADECIMIENTOS

- A mi asesora, Prof. Mag. Elena Quillama Polo, por introducirme y orientarme en la investigación microbiológica de levaduras, por los medios puestos a mi disposición y por brindarme su conocimiento en lo profesional y sus consejos en lo personal.
- A los profesores miembros del Jurado de la Facultad de Ciencias Biológicas que con sus observaciones y sugerencias me ayudaron a culminar la elaboración del presente trabajo.
- Al Sr. Ramón Rivas, ex regidor de Lunahuaná, por su colaboración en la obtención de las muestras de “Cachina” de las bodegas más importantes de dicho distrito.
- A mis hermanos y demás miembros de mi familia por estar ahí, por mostrarme ese ánimo especial y por mantenernos unidos hasta en los momentos más difíciles.
- A mis compañeros tesisistas y alumnos practicantes del Laboratorio de Microbiología Industrial y Biotecnología Alimentaria, por su compañía durante la elaboración de la parte experimental de mi tesis, por su amistad y gratos momentos compartidos, especialmente a mi amiga Liz Cruz Pío.

CONTENIDO

Pags.

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCION.....	1
II. ANTECEDENTES.....	5
III. MATERIAL Y METODOS.....	11
3.1. MATERIAL.....	11
3.1.1 Material Biológico	11
3.1.2 Muestras.....	11
3.2 MÉTODOS.....	12
3.2.1. Toma de muestras.....	12
3.2.2. Procesamiento de las muestras: Aislamiento primario.....	13
3.2.3. Caracterización fenotípica de las levaduras.....	13
a. Morfología de las células vegetativas.....	13
b. Crecimiento en medio líquido.....	14
c. Crecimiento en medio sólido.....	14
d. Determinación de la capacidad de filamentización.....	14
e. Determinación de la capacidad de esporulación.....	14
f. Fermentación de carbohidratos.....	15

g. Asimilación de carbohidratos.....	15
h. Asimilación de sustancias nitrogenadas.....	16
i. Hidrólisis de la urea.....	16
3.3.4. Selección de levaduras.....	16
a. Tolerancia a altas concentraciones de etanol.....	16
b. Tolerancia a altas concentraciones de glucosa.....	17
c. Detección del factor killer.....	17
d. Resistencia a anhídrido sulfuroso.....	17
IV. RESULTADOS.....	18
4.1 Aislamiento e identificación de levaduras.....	18
4.2 Caracterización fenotípica de levaduras.....	19
4.3 Preselección de levaduras aisladas.....	20
4.4 Pruebas de Selección de levaduras.....	20
4.4.1. Tolerancia al etanol.....	20
4.4.2 Tolerancia a glucosa.....	21
4.4.3 Determinación del factor killer	21
4.4.4 Crecimiento a distintas concentraciones de anhídrido sulfuroso (SO ₂).....	22
TABLAS.....	23
FIGURAS	36
V. DISCUSIÓN	42
VI. CONCLUSIONES	47
VII. RECOMENDACIONES.....	48
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	51
ANEXO A: PROTOCOLOS	57
ANEXO B: MEDIOS DE CULTIVO	62

RESUMEN

La “Cachina” o vino joven es una bebida obtenida por fermentación espontánea de la uva, involucra el desarrollo secuencial de varias especies de levaduras, como responsables de la fermentación alcohólica asociadas a las uvas y a los equipos de la bodega que se utilizan durante la producción artesanal de la bebida (Fleet, et al. 1984).

El objetivo del presente estudio es seleccionar y caracterizar cepas nativas de levaduras asociadas a Cachina de las bodegas de Lunahuaná a través de metodologías simples y factibles para ser utilizadas como cultivos iniciadores en la vinificación de la región, favoreciendo a una mayor estabilización microbiológica y asegurando la calidad de la bebida.

La caracterización y los criterios de selección de levaduras se basan en ciertas características metabólicas y fisiológicas. Todas las levaduras aisladas fueron sometidas a pruebas de identificación según Kreger-van Rij (1984) y Kurtzman y Fell (1998). Para la selección de levaduras se evaluaron las propiedades como tolerancia al etanol y altas concentraciones de glucosa (Osho, 2005), detección de la actividad killer (Sangorrín et al, 2002) y resistencia a anhídrido sulfuroso (Regodón, 1998).

A partir de Cachina, se identificaron 88 cepas a nivel de especie. Las especies encontradas y su frecuencia de aparición fueron *Saccharomyces cerevisiae* 64% (56), *Kloeckera apiculata* 23% (20), *Saccharomyces sp.* 11% (10), *Candida sp.* 2%(2). De 17 cepas *Saccharomyces cerevisiae* preseleccionadas debido a su habilidad fermentativa fueron probadas mediante metodologías simples de selección. La cepa *S. cerevisiae* 2CA.1 destacó entre todas, por tener poder fermentativo, tolerar significativamente concentraciones de 10% de etanol, crecer óptimamente en 20% de glucosa y resistir concentraciones elevadas de anhídrido sulfuroso (hasta 300mg/l), además de ser productoras de toxinas killer, lo cual indicaría su gran capacidad de adaptación para imponerse como posible iniciador en el mosto de uva y lograr elaborar vinos estandarizados y de calidad.

ABSTRACT

The Cachina or the young wine is a beverage obtained by spontaneous fermentation of the grape, involves the sequential development of various species of yeasts. as representatives of the alcoholic fermentation associated with grapes and winery equipment are used during the production of handicrafts drinking. (Fleet et. al. 1984).

The aim of this study is to identify and characterize yeast strains associated with native Cachina of Lunahuaná wineries through simple and feasible methods to be used finally as starter cultures in winemaking in the region, favoring a further stabilization and ensuring the microbiological quality of the drink.

Characterization and selection criteria are based on yeast metabolic and physiological characteristics. All yeast isolates were tested for identification according Kreger-van Rij (1984) and Kurtzman and Fell (1998). For selection yeast were assessed according properties such as tolerance to ethanol and high concentrations of glucose (Osho, 2005), detection of killer activity (Sangorrín et al, 2002) and resistance to sulfur dioxide (Regodón, 1998).

From 88 yeast isolated and identified to species level. The species found and their frequencies of occurrence were *Saccharomyces cerevisiae* 64% (56). *Kloeckera apiculata* 23% (20), *Saccharomyces sp.* 11% (10), *Candida sp.* 2% (2). 17 strains of *Saccharomyces cerevisiae* preselected due to their fermentative abilities were tested using simple methodologies for selection. The strain *S. cerevisiae* 2CA.1 distinguish from all the yeast for having a great fermentative ability, significantly tolerate concentrations of 10% ethanol, grow optimally in 20% glucose and resist high concentrations of sulfur dioxide (up to 300 mg /l), as well as toxin-producing killer , indicating its great capacity to being a possible starter in the grape most and to produce wines of quality and standardized.

I. INTRODUCCIÓN

La vid (*Vitis vinifera L.*) es una planta que se cultiva tradicionalmente en la costa sur del Perú, principalmente en Lima, Ica, Arequipa, Moquegua y Tacna, y ha sido introducido por los españoles a fines del siglo XVI (Ramos, 2002). La época de vendimia o cosecha de uvas en éstas regiones ocurre entre Enero y Marzo, y es destinado para consumo directo y elaboración de vinos.

En el valle de Lunahuaná ubicado a 160 km. al sureste de la ciudad de Lima, considerada un distrito vitivinícola por sus condiciones medio-ambientales, especial microclima y calidad de tierra, se cultivan diferentes variedades de uvas como el Moscatel de gran aroma y fragancia; Italia, variedad aromática; Quebranta, uva exclusiva del Perú y Uvina, uva peruana adaptada para crecer en Lunahuaná y distritos aledaños, entre otras como Mollar y Negra Corriente.

La Cachina es una bebida obtenida por fermentación espontánea a partir de diferentes variedades de uva. Para su elaboración una vez recogida la uva, se selecciona y se prensa, luego se retira los raspones del racimo para evitar sabor amargo. De esta manera, el mosto se vierte en las cubas de fermentación, que generalmente son de cemento y están empotradas en el suelo, para que la temperatura del proceso no varíe en exceso con los cambios climáticos. La fermentación alcohólica se inicia en las cubas por efecto de las levaduras nativas, ya que habitualmente no se añaden cepas comerciales. La duración de la fermentación alcohólica oscila entre 8 y 10 días (Ibarra, 2004).

La microbiología enológica tiene su origen en los estudios de Louis Pasteur, el cual en 1858 demostró que las levaduras eran las responsables de la fermentación alcohólica y que ciertas bacterias eran causantes del deterioro de los vinos. Desde entonces la microbiología de la vinificación ha sido extensamente estudiada y en consecuencia se ha revelado la gran complejidad de la ecología microbiana de las fermentaciones.

Los estudios relacionados con la viticultura a nivel mundial han mostrado un auge en los últimos años, sin embargo la investigación enológica en el Perú no ha reflejado este mismo avance. Los hallazgos de la diversidad de levaduras nativas

benéficas o perjudiciales que intervienen en la fermentación de la Cachina (vino joven) elaborados en la costa peruana son escasos, en otros países como España se ha reportado que en los vinos obtenidos por fermentación espontánea, ciertas cepas de *Kloeckera apiculata*, *Candida vini*, *C. stellata*, *C. pulcherrima*, *Pichia membranaefaciens*, *Hansenula anomala* y *Brettanomyces intermedius* pueden ocasionar problemas durante la fermentación, incrementado la acidez volátil, oxidando el etanol, produciendo turbidez en los vinos y formando velos blanquecinos en la superficie de los vinos de poca graduación conservados en malas condiciones sanitarias.

Además se ha demostrado que el crecimiento de las levaduras que se encuentran en la flora inicial de la uva junto a otros microorganismos afecta las características organolépticas del mosto y en algunos casos las bacterias lácticas producen también cantidades elevadas de ornitina, que pueden impedir el desarrollo correcto de levaduras (Castino, 1994). Por otro lado las bacterias acéticas como *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter aceti* y *A. pastorianus* presentes en vinos pueden afectar la calidad del producto por contaminación inicial de la uva, creciendo durante la fermentación alcohólica y la etapa de almacenamiento del vino (Regodón, 1997).

Durante la fermentación espontánea de los mostos pueden intervenir un gran número de variables que hacen inestable e insegura la fermentación y la calidad del producto como la demora en el inicio de la fermentación y consumo parcial de azúcares fermentables por levaduras con poco poder fermentativo, temperaturas variables que generalmente provocan la parada del proceso fermentativo, poca aireación del mosto al comienzo del proceso y precaria higiene, (Torija M.J., 2002; Suarez e Iñigo, 1992).

En Lunahuaná, región que basa su economía en la agricultura, viticultura y turismo, la elaboración de cachina es básicamente artesanal, sin cuidados en el control, con el riesgo de obtener un producto que es resultado de una interacción con otros microorganismos perjudiciales y otros factores ya indicados. La selección de cepas nativas de levaduras podría ser utilizada para mejorar la calidad del vino.

El estudio de la dinámica, cuantificación y composición de la microbiota responsable de las fermentaciones espontáneas de vinos ha mostrado diferencias tanto cualitativas como cuantitativas de las levaduras aisladas en una misma zona vitivinícola

e incluso dentro de los depósitos de una misma bodega. Las causas de esta variabilidad son factores climáticos, microbiológicos y tecnológicos, por tanto la necesidad de asegurar la fermentación alcohólica así como la tipicidad y reproducibilidad de los vinos requieren cada vez más el uso de cultivos iniciadores autóctonos. A pesar de que existen levaduras comerciales para realizar las fermentaciones, es más efectivo el uso de cultivos puros de levaduras que procedan de la zona vitivinícola donde se van a utilizar, lo que se conoce como levaduras locales seleccionadas, ya que se conoce que las levaduras que se encuentran en una microzona son específicas del área, totalmente adaptadas a las condiciones climáticas de la zona, completamente adaptadas a la materia prima, es decir, al mosto a fermentar y responsables, al menos parcialmente de las características sensoriales únicas de los vinos obtenidos (Torija, 2002).

Debido a que la calidad del vino está estrictamente relacionada con la flora microbiana típica que se desarrolla durante la fermentación, existe una demanda creciente por conocer la sucesión ecológica de la microflora durante el proceso de fermentación natural como primer paso para lograr la selección de cepas con potencialidad enológica.(Capello, 2004) La capacidad para determinar la presencia de estas especies en las uvas, vinos y bodegas, etc. es fundamental para entender el proceso de formación del vino, mejorar su calidad y prevenir alteraciones de origen microbiano (Regodón, 1997).

En la industria vitivinícola de los países como Italia, Francia y España, la producción de vinos se ha venido elaborando durante siglos mediante fermentación espontánea de los mostos. En los últimos años se observa una mayor tendencia a realizar las fermentaciones con inóculos de levaduras locales seleccionadas, generalmente del género *Saccharomyces* con el fin de asegurar el mantenimiento de las características típicas de los vinos de la zona en cuestión y elevada calidad enológica (Regodón, 1997).

Cuando se añade al mosto un cultivo de levadura local seleccionada, cuya concentración se encuentra en exceso frente a las levaduras silvestres, la cepa añadida se convierte en el agente dominante durante la fermentación alcohólica. Aunque no cabe descartar la contribución de las levaduras silvestres al sabor y aroma de los vinos, la

levadura dominante es la que más aporta la mayoría de los aromas secundarios producidos durante la fermentación (Melero, 1992).

En la actualidad, las investigaciones están orientadas hacia el estudio de nuevas cepas levaduriformes locales con propiedades de interés biotecnológico. Para la selección de cepas es esencial establecer cuáles son sus propiedades enológicas. Hay diferentes criterios de selección que se pueden dividir en: favorables (tolerancia al etanol, buen rendimiento en la transformación de los azúcares en etanol, capacidad de crecer en altas concentraciones de azúcar, resistencia a concentraciones moderadas de anhídrido sulfuroso, carácter killer, degradación del ácido málico, etc.) y desfavorables (como la producción de anhídrido sulfuroso, producción de espuma o acidez volátil) (Vázquez et al, 2000).

Según Curnier, la utilización de levaduras seleccionadas puede evitar alteraciones químicas y microbiológicas en las primeras fases de la fermentación. También, puede evitar anomalías en la fermentación, como paradas espontáneas, o mejorar la composición química e influir en la calidad, tanto gustativa como aromática del vino. (Querol, 1992). Además es necesario resaltar la importancia tecnológica de seleccionar levaduras con carácter Killer, como una herramienta útil y efectiva en el control de levaduras silvestres contaminantes que causan retrasos de la fermentación o sabores desagradables en los vinos. (Rodríguez et al, 1998). El carácter killer en levaduras radica en la capacidad que tienen ciertas cepas de sintetizar y secretar una toxina proteica (factor Killer) que resulta letal para otras cepas de levaduras. Las levaduras productoras del factor Killer son inmunes a las toxinas que ellas mismas producen (Zagorc et al, 2001).

El objetivo del presente estudio es caracterizar y seleccionar cepas nativas de levaduras asociadas a Cachina de bodegas de Lunahuaná a través de metodologías simples, efectivas y factibles para ser utilizadas como cultivos iniciadores en la vinificación de la región, y brindar mejores características enológicas y propiedades organolépticas al producto.

II. ANTECEDENTES

La industria vitivinícola en el Perú juega un papel en los aspectos económico y social desde la época de la colonia. Según los registros de las crónicas en relación a los cultivos de vid en la costa, Reginaldo Lizárraga, fraile de la orden de San Agustín, señaló al valle de Lunahuaná en Cañete como uno de los centros más importantes en la producción de uvas y vinos (Huertas L., 2004), cuya industria enológica continúa actualmente en pleno desarrollo.

Las uvas representan una fuente principal de microorganismos en la producción de vinos, consistiendo en su mayoría de levaduras y varias especies de bacterias lácticas. La transformación de la uva en vino es principalmente un proceso de fermentación tradicionalmente llevados a cabo por las levaduras indígenas y la composición de esta flora contribuye significativamente en las características sensoriales del vino. El rol primario de las levaduras vínicas es catalizar la conversión rápida, completa y eficiente de las hexosas particulares de la uva, en etanol, dióxido de carbono y otros metabolitos (Capello, et al 2004). La composición cualitativa y cuantitativa de la microbiota de las levaduras en mostos fermentados depende principalmente de los siguientes factores: región de origen de la uva, variedad y madurez de la uva, tipo de bebida producida, temperatura, pH y concentraciones de anhídrido sulfuroso (SO_2) y etanol (Satora et al, 2005).

Como se sabe, la calidad del vino es consecuencia de la diversidad y la composición de los microorganismos, por lo que es importante conocer su dinámica y frecuencia de aparición durante el desarrollo de la fermentación.

Numerosos estudios en diversas regiones del mundo han identificado las principales especies de levaduras que se desarrollan durante la fermentación. Normalmente la fermentación es iniciada por varias especies de bajo poder alcoholígeno y cierto poder oxidativo, como *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Rhodotorula*, *kluyveromyces* y *Candida* seguida de *Metschnikowia* y *Pichia*. Estas levaduras crecen, hasta poblaciones totales del orden de 10^6 - 10^7 células /ml, durante los 2 ó 3 primeros días de fermentación. Durante este tiempo, ellas han utilizado suficiente azúcar y aminoácidos

presentes en el jugo y a su vez han generado suficientes cantidades de productos finales dando un rasgo sobre el carácter del vino. Seguidamente comienzan a morir debido al aumento de la concentración de etanol en el medio, dando paso a cepas más resistentes al etanol y con mayor poder fermentativo como *Zygosaccharomyces*, *Torulaspora* y *Saccharomyces*. Acaban finalmente la fermentación distintas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales van aumentando gradualmente su población desde el principio hasta constituir prácticamente el 100% de las levaduras en la fase exponencial. (Schütz et al 1993, Fleet, 1999, Redzepovic, 2002, Capello, et al 2004, Satora, et al 2005).

Fleet y col. (1984) determinaron los niveles de levaduras que se desarrollan naturalmente en vinos de Francia, encontrando que las levaduras del género *Rhodotorula*, *Pichia*, *Candida* y *Metschnikowia* se presentan en bajos niveles en extracto fresco de mosto de uva, pero mueren tan pronto la fermentación se inicia. *Kloeckera apiculata*, *Torulopsis stellata* y *Saccharomyces cerevisiae* dominan en el mosto conduciendo la fermentación alcohólica. *K. apiculata* y eventualmente *T. stellata* mueren a medida que la fermentación progresa, dejando a *S. cerevisiae* como la levadura dominante durante el proceso de fermentación alcohólica.

Ethiraj y col. (1980) estudiaron cualitativamente la secuencia de levaduras durante la fermentación de manzanas desarrolladas en India. La diferenciación de levaduras se realizó a través de sus características morfológicas y bioquímicas. La diversidad encontrada es similar a la microflora presente en mostos de uvas. Sin embargo, el proceso de fermentación de jugo de manzana es conducido por una sola especie de *Saccharomyces*, conocida como *S. chevalieri*. Esta diferencia en la flora se puede deber a las variaciones climáticas entre la India y otros países.

Redzepovic y col. (2002) lograron identificar, diferenciar y caracterizar cepas indígenas de *Saccharomyces* aisladas de vinos croatianos. Además evaluaron sus potencialidades enológicas mediante métodos fisiológicos y genéticos moleculares. Ellos afirmaron que *S. paradoxus* posee características potenciales y se presenta en mayor número que *S. cerevisiae*.

Capello y col. (2004) lograron discriminar a nivel de especie la población autóctona de cepas de *S. cerevisiae* presentes en el mosto de 12 variedades de uvas en

un viñedo de Abulia (Italia), mediante métodos morfológicos, fisiológicos y moleculares. Cada aislado fue identificado por análisis de secuencias moleculares y siguiendo el criterio usual de morfología, formación de esporas, resistencia a etanol (12,14 y 15%) y SO₂ (0.1 y 0.15 g/l), cuantificación de H₂S y asimilación de carbohidratos. Las cepas *S. cerevisiae* seleccionadas presentaron importantes propiedades enológicas potenciales.

Todos los autores están de acuerdo en la preponderancia de *S. cerevisiae* varios días después de iniciada la fermentación espontánea, por lo que es sin duda, la principal levadura de los vinos. Actualmente, se reconoce que algunas cepas de esta especie producen vinos mejores que otras, lo cual ha llevado al considerable desarrollo de la selección de estas levaduras para utilizarlas como inóculos en fermentaciones dirigidas. (Regodón, 1997).

La idea de usar cultivos puros de levaduras comenzó con Pasteur y Hansen, aplicándose inicialmente sólo a la fabricación de cerveza. A principios del siglo XX se comienza a usar cultivos de levaduras seleccionadas en Europa y Sudáfrica (Regodón, 1997). Desde mediados de los años 60, en que se produjeron las 2 primeras levaduras comerciales *Saccharomyces cerevisiae* (Montra Chet y Pasteur Champagne), las cuales fueron utilizadas universalmente como iniciadores en todo tipo de fermentaciones con éxito limitado, pronto se demostró que estas cepas no eran una solución universal para la fermentación del mosto debido a la variedad de regiones del mundo y sus respectivas variedades de uva. (Torija M.J, 2002).

Schutz y Gafner (1993) analizaron la diversidad de levaduras durante la fermentación alcohólica espontánea e inducida. Para distinguir entre *Saccharomyces* y otras especies de levaduras, se realizaron pruebas fisiológicas y para diferenciar entre cepas *S. cerevisiae* se utilizó el método del cariotipaje de cromosomas. La fermentación espontánea estuvo dominada por *Metschnikowia pulcherrima* y *Hanseniaporu uvarum* en la primera fase, mientras que *S. cerevisiae* se detectó hasta la última etapa de la fermentación alcohólica, detectándose la competencia de diferentes cepas de *S. cerevisiae*. En la fermentación inducida, se detectaron las cepas de *S. cerevisiae* en todo el proceso de fermentación, encontrándose además al inicio de la fermentación *H. uvarum*, la cual daría un efecto positivo sobre el gusto y aroma de los vinos.

Regodón y col. (1997) desarrollaron un procedimiento simple y efectivo para seleccionar levaduras de vinos de España, obtenidos por fermentación espontánea, basándose en las características tecnológicas de levaduras como crecimiento a altas temperaturas, resistencia a dióxido de azufre, fenotipo killer, producción de espuma, acidez volátil, seleccionando cepas para realizar pruebas de microvinificación produciendo vinos de mayor aceptación que los producidos por fermentación espontánea.

Benítez y col. (1983) examinaron cepas de *S. cerevisiae* aisladas de viñedos en Andalucía y Extremadura (España); inocularon cultivos de levaduras en medio líquido YPG (Extracto de levadura, Peptona, Glucosa) suplementado con 10, 15 ó 18% de etanol o 50% de sacarosa e incubadas a 22 o 37°C, encontrando una enorme variedad en la capacidad de crecer y fermentar a diferentes concentraciones de etanol y azúcar, demostrando que la inhibición del crecimiento incrementa con la concentración del etanol y que la capacidad fermentativa fue solo inhibida a altas concentraciones de etanol. Las cepas seleccionadas crecieron en 15% de etanol y fermentaron a 18% de etanol.

Ezeogu y col (1993) aislaron ocho levaduras *Saccharomyces* a partir de un vino popular de Nigeria, mostrando variadas tolerancias a altas concentraciones de etanol y sacarosa. El crecimiento fue medido mediante densidad óptica a 595 nm y expresados como tiempo de generación. Las 2 mejores cepas aisladas dieron tiempo de generación menor que 25 h. en 18% de etanol v/v y produjeron 13.1% de etanol en medio YPG suplementado con 50% de sacarosa.

Bilbao y col (1997) examinaron los efectos de la temperatura (10° y 25°C) sobre el crecimiento de cultivos solos y mixtos de *Kloeckera apiculata* y *Saccharomyces cerevisiae* empleando un medio basado en jugo de manzana para los ensayos de fermentación, resultando que a 10°C, *S. cerevisiae* obtuvo la mayor población en cultivos puros y mixtos, mientras que el crecimiento de *K. apiculata* aumentó a 10°C tanto en cultivos puros y mixtos en comparación con los resultados obtenidos a 25°C

Ubenda y col (1998) lograron aislar 74 levaduras del género *Saccharomyces* de las bodegas en la región de Valdepeñas (España) para estudiar sus propiedades

enológicas como tasa de fermentación, producción de SO₂, capacidad de floculación, tolerancia a SO₂, etanol, y altas presiones osmóticas, síntesis de toxina killer y actividades enzimáticas como la actividad estereasa, proteinasa, β-gluconoronidasa y polygalacturonasa. De todas las cepas el 68% fermentaron sobre 0.25 g CO₂ liberados por litro y hora, lo cual indica que estas cepas podrían ser adecuadas para la industria del vino. Sin embargo el 61% produjeron SH₂, una característica indeseable en las levaduras de vino y 42% fueron floculantes en variados grados. Todas las cepas fermentaron a 10° de etanol. Asimismo todas las cepas estudiadas toleraron 300 mg/l de SO₂ y crecieron a 30° Brix. Además la mayoría de las cepas resultaron killer resistentes. Con respecto a su actividad enzimática, todas cepas presentaron actividad estereasa, sin embargo ninguna mostró actividad proteinasa. Con respecto a la actividad glucosidasa, solo α - glucosidasa y β-glucuronidasa fueron observadas en la mayoría de las cepas. El estudio también mostró que la actividad β-glucosidasa es muy raro en cepas de *Saccharomyces*.

Morata y col. (1999) lograron seleccionar 2 especies de levaduras *S. bayanus* y *S. cerevisiae* a partir de 114 cultivos puros. Como pruebas de selección se realizaron la determinación del poder fermentativo, acidez volátil, cinética fermentativa, resistencia a SO₂ y producción de glicerina evaluada mediante análisis enzimático.

El carácter killer en levaduras fue reportado por primera vez por Bevan y Makower (1963), y radica en la capacidad de ciertas cepas de sintetizar y segregar sustancias de naturaleza proteica o glicoproteica (factor killer), que resultan letales para otras cepas de levaduras de su mismo género y/o especie denominadas cepas sensibles. Las cepas de levaduras productoras del factor killer (fenotipo K+R+), son inmunes a las toxinas que producen. Adicionalmente a las cepas killer y a las sensibles (K-R-), existen otros tipos de cepas denominadas neutras (K-R+), estas que si bien no producen toxinas, son resistentes a la acción de las mismas (Izgü y col., 1997; Cansado y col., 1991)

Cansado y col. (1991) investigaron la presencia de levaduras con fenotipos killer, resistentes y sensibles en poblaciones de *Saccharomyces cerevisiae*, en tres vinerías de España. De un total de 900 especies de levaduras aisladas, 392 correspondió a *S. cerevisiae*, siendo el 22.4% killer positivos. Asimismo, demostraron que la

producción de las toxinas killer era afectada por diversos factores: elevada concentración de azúcar, altas temperaturas y ciertos valores de pH.

Rodríguez y col. (1998) llevaron a cabo una caracterización fenotípica de la actividad Killer de 404 cepas de *S. cerevisiae* aisladas de vinos procedentes de 2 comarcas vitivinícolas españolas. La investigación demostró que la distribución de los fenotipos Killer de las cepas de *S. cerevisiae* difirió significativamente entre las dos comarcas estudiadas. Este comportamiento se relaciona con la existencia de barreras topológicas y ecológicas entre viñedos que dificultarían la dispersión azarosa de las cepas de levaduras de dichas comarcas.

Soarez y col. (2000) logró caracterizar la toxina killer producida por la levadura *S. cerevisiae* Y500-4L aislada a partir de mosto en Brasil, denotando que la actividad óptima de la toxina se logra entre valores de pH 3.8-4.5 y a temperaturas de 22 y 25°C.

Sangorrín y col. (2001) lograron evaluar el fenotipo killer en levaduras de la región de Comahue concluyendo que la actividad de la toxina killer era relativamente baja en la población de levaduras analizadas y la presencia de cepas sensibles era mayor.

Osho (2005) evaluó la tolerancia de levaduras aisladas de jugo de manzana fermentado, a diferentes concentraciones de etanol y azúcar glucosa obteniéndose 4 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* capaces de crecer en condiciones de estrés osmótico, 12% de etanol y 25% de azúcar.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL:

3.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

- **Cepas patrones:**

Saccharomyces cerevisiae P453: Cepa con fenotipo sensible

Saccharomyces cerevisiae YAT 674 K1: Cepa con fenotipo killer

Ambas cepas de origen vitivinícola, procedentes de la Universidad Nacional de Comahue-Argentina.

3.1.2 MUESTRAS

Las muestras de Cachina, elaboradas con diversas variedades de uvas de Lunahuaná fueron obtenidas a partir de diferentes tiempos de fermentación espontánea. Asimismo se recolectaron 3 variedades de uvas para extraer los mostos respectivos con el fin de realizar un seguimiento de la microflora nativa responsable de la fermentación alcohólica a nivel de laboratorio, tal como se indica en el siguiente listado.

- Cachina Acholada (15 días de fermentación)
- Cachina de uva Borgoña (9 días de fermentación)
- Cachina de uva Borgoña Blanca (15 días de fermentación)
- Cachina de uva Borgoña Blanca (30 días de fermentación)
- Cachina de uva Moscatel (6 días de fermentación)
- Cachina de uva Quebranta (1 día de fermentación)
- Cachina de uva Uvina (6 días de fermentación)
- Cachina de uva Uvina (9 días de fermentación)
- Cachina de uva Uvina (15 días de fermentación)
- Cachina de uva Uvina (20 días de fermentación)
- Uva Quebranta (Seguimiento del proceso de fermentación cada 7 días hasta el día 40).
- Uva Uvina (Seguimiento del proceso de fermentación cada 7 días hasta el día 20).
- Uva Italia (Seguimiento del proceso de fermentación cada 7 días hasta el día 60).

3.2.- METODOS

3.2.1.- TOMA DE MUESTRA

La toma de las muestras de Cachina se realizó en frascos estériles de 200 ml y fueron etiquetados conteniendo los siguientes datos:

- Nombre de la muestra
- Variedad de la uva
- Tiempo de fermentación
- Fecha de recolección
- Localidad

Tras su inmediato transporte al laboratorio se realizó su procesamiento.

La toma de muestras de las tres variedades de uvas Quebranta, Uvina e Italia (1 Kilogramo de c/u) se realizaron en bolsas de primer uso y fueron transportadas al laboratorio en contenedores fríos. En el Laboratorio, cada tipo de uva fue estrujada directamente en un recipiente aséptico usando un par de guantes estériles para cada tipo de uvas. Luego el mosto fue transferido asépticamente en damajuanas de 2 litros, cubiertos con gasas para evitar alguna contaminación externa. El mosto permaneció en la damajuana durante 2 días para permitir el desarrollo poblacional de levaduras en condiciones de aerobiosis. Posteriormente el mosto fue transferido a envases estériles de menor volumen para dar las condiciones anaeróbicas que permitieron llevar a cabo la fermentación. El seguimiento de la fermentación se realizó tomando las muestras de los mostos respectivos. Para el mosto de la uva Quebranta, a los 1, 7, 14, 21, 28 y 40 días de fermentación. Para el mosto de la uva Uvina se ensayaron los días 1, 7, 21, 28 y 40 de fermentación. Para la uva Italia, se obtuvieron muestras a los 6, 15, 25 y 60 días de fermentación

3.2.2.- PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS: AISLAMIENTO PRIMARIO

Para el aislamiento de levaduras nativas, se tomaron alícuotas (0.1 ml) a partir de muestras diluidas de cachinas y mostos, y se sembraron sobre placas de petri con medio agar YPG pH 5,5. La incubación se realizó a 30°C por 72 horas. Transcurrido este tiempo se procedió a la lectura de las características morfológicas de las colonias y se seleccionaron independientemente 2 a 3 colonias morfológicamente similares de cada tipo aparecidas en cada placa, asignándoles un código respectivo.

Una vez obtenido los cultivos crecidos y activos, se analizó la pureza de los cultivos mediante examen microscópico para su adecuada conservación, la cual se realizó sembrando las cepas en frascos viales conteniendo agar YPG 1,5%. El mantenimiento en cepario se realizó a 4°C.

3.2.3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS LEVADURAS

La caracterización de los principales grupos microbianos de levaduras, se realizó sobre las bases de las características morfológicas, reproducción vegetativa y sexual, criterios bioquímicos y fisiológicos de los cultivos puros de levaduras aisladas.

a. Morfología de células vegetativas.

Las células levaduriformes corresponden a formas globosas, subglobosas, elipsoidales, ovoidales, cilíndricas, botuliforme, elongada, apiculada, ogival, lunada o triangular. La forma puede reflejar el modo de reproducción y, en algunos casos, ésta es una característica de un género o una especie particular. La morfología de las células fue observada por microscopia a partir de un cultivo de 18-24 horas en caldo YPG a 30°C, mediante la técnica de Coloración Gram (Kühle et al, 1998).

b. Crecimiento en medio líquido.

El crecimiento de levaduras en medio líquido puede resultar en la formación de un sedimento compacto, coherente, floculento o mucoide, un anillo, una película o islote flotante en la parte superior del caldo. La película, si se forma, puede ser seca, húmeda, opaca, brillante, suave, arrugada o como deslizándose a los lados del frasco.

El comportamiento del crecimiento microbiano en medio líquido, fue evaluado visualmente a las 24 horas de crecimiento en medio líquido YPG pH 5.5 a 30°C (Kühle et al, 1998).

c. Crecimiento en medio sólido:

La observación de las colonias en medio sólido permite asociar la forma de crecimiento, la presencia de pigmento, mediante el color, la textura, la elevación, etc.

El comportamiento cultural de las colonias, fueron descritas en cultivos de 72 horas de crecimiento en agar YPG pH 5.5, incubadas a 30°C (Kurtzman, 1998).

d. Determinación de la capacidad de filamentización.

Para la formación de pseudomicelio se utilizó un cultivo en lámina empleando una placa petri conteniendo una varilla en forma de “v” en la cual se apoya la lámina, los cuales fueron previamente esterilizados por calor seco. El medio Agar Arroz Almidón (A.A.A.) pH 6,0 autoclavado a 121°C por 15 minutos fue fundido y colocado 2,5 ml sobre la lámina portaobjeto con ayuda de una pipeta estéril. Después de la solidificación del agar, los cultivos puros de levaduras suspendidas en solución salina estéril fueron estriados en la superficie del agar. Finalmente se colocó un trozo de algodón humedecido estéril dentro de la placa. La incubación se realizó a 30°C durante 5 a 7 días. Para la evaluación, la lámina sembrada fue extraída de la placa petri y examinada microscópicamente (Kurtzman, 1998).

e. Determinación de la capacidad de esporulación.

La esporulación de levaduras indica la formación de esporas sexuales mediante un proceso de división sexual o meiosis.

Para observar la capacidad de esporulación, los cultivos activos de 24 horas de crecimiento fueron sembrados en medio líquido MYPG (Extracto de malta, Extracto de levadura, peptona, glucosa) pH 5,5 e incubados a 30°C por 24 horas. Luego de este tiempo, se observó el crecimiento en medio líquido y el cultivo fue centrifugado, lavado en solución salina estéril (0.85%) y se procedió a sembrar un inóculo en agar acetato pH 7,5 - 8.0. La incubación se realizó a 30°C durante 7 días. Para lograr la observación de esporas se realizó la coloración de Kinyon (Ver apéndice) a las 48 horas, 4 días y 7 días (Kurtzman, 1998 y Fowell, 1960).

f. Fermentación de los carbohidratos.

La capacidad de las levaduras de fermentar carbohidratos fue evaluado en un medio base de fermentación YP (extracto de levadura, peptona de carne) conteniendo diferentes azúcares galactosa, glucosa, maltosa, lactosa, rafinosa y sacarosa al 1%, utilizando como indicador del medio, púrpura de bromocresol. Los cultivos activos de 24 horas de crecimiento fueron centrifugados y los pelets de cada cepa fueron resuspendidos en solución salina estéril. Un inóculo de 0.1 ml de la suspensión se agregó a la batería de tubos conteniendo los azúcares respectivos, posteriormente se añadió una capa de vaspar sobre el medio líquido para otorgarle condiciones anaeróbicas. La lectura se realizó a las 24 horas detectándose por el viraje del indicador de púrpura hacia amarillo y la producción de gas fue evaluada mediante la altura de la elevación de la capa de vaselina – parafina (vaspar) (Wickerham, 1951).

g. Asimilación de carbohidratos

La capacidad de asimilar carbohidratos por las levaduras fue evaluada según el medio base Peptona de Carne 0.5% y NaCl 0.25% descrito por Kreger-van Rij (1984). Los cultivos puros centrifugados fueron resuspendidos en solución salina y 0.1 ml de la suspensión fue inoculada en el medio base conteniendo diferentes azúcares galactosa, glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa, rafinosa, en condiciones aeróbicas. Las lecturas confirmativas se realizaron a las 24 horas.

h. Asimilación de sustancias nitrogenadas

La capacidad de asimilar sustancias nitrogenadas fue evaluada según Kreger van Rij (1984). Las levaduras fueron sembradas por moteado en tres placas Petri con medio de asimilación Yeast Carbon Base conteniendo como fuente de nitrógeno peptona en la primera placa (control positivo), la segunda placa, agar yeast carbon yeast sin fuente de nitrógeno (control negativo) y la última placa presentó dicho medio y como fuente de nitrógeno la sal nitrato de potasio. La incubación se realizó a 30°C y las lecturas se efectuaron a las 48-72 horas. Se consideró resultado positivo cuando se observó buen crecimiento en el medio que contiene nitrato de potasio.

i. Hidrólisis de la úrea

Para determinar la presencia de la enzima ureasa en las cepas de levaduras, se sembró cultivos activos en tubos conteniendo agar inclinado con urea de Christensen. Se incubaron a 30°C y la observación de la reacción se realizó a las 24 horas, hasta las 96 horas. (Kurtzman, 1998).

3.2.4 SELECCIÓN DE LEVADURAS

Las levaduras con alto poder de fermentación detectadas por la mayor producción de CO₂ en las pruebas de fermentación del carbohidrato glucosa (principal carbohidrato en los mostos de uva) fueron las cepas preseleccionadas para realizar las siguientes pruebas de selección.

a. Tolerancia a altas concentraciones de etanol

Para determinar la tolerancia a etanol, los cultivos activos en fase logarítmica fueron inoculados a 3 ml de medio líquido YPG pH 5.5 conteniendo 0%, 4%, 8%, 10% y 12% de etanol, a partir de una Densidad Óptica (D.O.) inicial de 0.1. Los tubos se incubaron a 30°C y se realizaron las lecturas de la D.O. a una longitud de 595 nm cada 4 horas durante 48 horas. Las cepas de levaduras que desarrollaron a una D.O. mayor que 1 después de 48 horas fueron considerados tolerantes a determinada concentración de etanol (Benítez et al, 1983, Shane Gold et al, 1992).

b. Tolerancia a altas concentraciones de glucosa.

El procedimiento se realizó según Ekunsanmi y Odunfa (1990). Los cultivos activos crecido en caldo YPG (Glucosa 2%) se inocularon a 3ml de medio líquido YPG a concentraciones de 100, 150, 200 y 250 g/L. Después de la inoculación se realizaron las medidas de la turbidez mediante espectrofotómetro a 540 nm durante intervalos de 4 horas por 48 horas (Osho, 2005).

c. Detección de la actividad Killer.

Para determinar levaduras con capacidad de producir la toxina Killer, 0.1 ml de la posible cepa sensible (24 horas de crecimiento) con D.O.=0,2 (560nm) fue inoculada en placas vacías estériles. Luego se incorporó 20 ml de agar YEPD-MB, tamponado a pH 4.5 con ácido cítrico 0.1M y bifosfato potásico 0.2M, previamente esterilizado en autoclave (121°C durante 15 minutos). Una vez solidificada la suspensión agarizada, las posibles cepas killer (24 horas de crecimiento) fueron sembradas por la técnica del moteado. Las placas se incubaron a 22°C por 48-72 horas (Sangorrín M. et al, 2001). Las cepas portadoras del fenotipo Killer fueron detectadas cuando apareció una zona clara de inhibición alrededor del inóculo moteado y/o una región azul alrededor del halo de inhibición (Tablas 9 y 10). La ausencia de las zonas claras alrededor de la colonia indicó resistencia de la cepa a dicha toxina.

d. Resistencia a anhídrido sulfuroso

El medio para la prueba de resistencia a anhídrido sulfuroso o dióxido de azufre (SO₂) fue el caldo Yeast Nitrogen Base 0.67% y glucosa 1%, suplementado con metabisulfito de potasio pH 3.5 –4.0. El medio fue repartido en tres tubos de ensayo para dar concentraciones de SO₂ total de 100, 200 y 300 mg/L respectivamente. Las cepas en estudio se incubaron a 30°C. El crecimiento se evaluó por medida de la Densidad Óptica de los cultivos a 590 nm durante las 24, 48 y 72 horas (Regodón, 1997).

IV. RESULTADOS

4.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS

A partir de 10 muestras de Cachina de diferentes variedades de uvas Italia, Moscatel, Quebranta, Borgoña y Uvina (Tabla 1) en procesos de fermentación de 1 a 30 días y de acuerdo al protocolo de aislamiento mencionado en la metodología se logró obtener 88 cultivos puros de levaduras. Todos los cultivos puros fueron utilizados para realizar las pruebas de identificación taxonómica según la metodología propuesta por Kreger-van Rij (1984) y Kurtzman y Fell (1998), y se incluyeron las características microscópicas de la morfología celular, el comportamiento de la colonia en medio sólido YPG pH 5.5, crecimiento en medio líquido YPG pH 5.5, formación de pseudomicelio, producción de esporas, asimilación de nitrato de potasio (KNO_3), producción de la enzima ureasa, así como las pruebas de asimilación y fermentación de diversos carbohidratos (Tabla 5).

Los recuentos de colonias de levaduras se dieron durante todo el proceso fermentativo, obteniéndose recuentos más altos los días 6 y 9 de fermentación con 1.4×10^9 UFC/ml en cachina de uva Moscatel y 3.6×10^8 UFC/ml en cachina de una Borgoña respectivamente. El número de células por ml disminuye evidentemente en muestras de Cachina de 30 días de fermentación (Tabla 1). Asimismo se registra el número y especies de levaduras aisladas a partir de uvas Italia, Quebranta y Uvina, las cuales fueron preparadas independientemente para el seguimiento microbiológico de la fermentación (Tabla 2, 3 y 4). Los datos muestran el predominio de *Saccharomyces cerevisiae* en el transcurso de la fermentación de mostos, excepto en los primeros días de fermentación que muestran la existencia de otras especies de levaduras nativas como *Kloeckera apiculata* y *Candida sp.* (Tablas 1, 2, 3 y 4).

Las especies de levaduras presentes en las muestras de Cachina elaborados a partir de diferentes variedades con tiempos de fermentación de 1, 6, 9, 15, 20 y 30 días fueron aisladas. Las especies encontradas y su frecuencia de aparición fueron *Saccharomyces cerevisiae* 63,6% (56), *Kloeckera apiculata* 22,7% (20), *Saccharomyces sp.* 11,4% (10), *Candida sp.* 2,3% (2) (Figura 1).

4.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LEVADURAS AISLADAS DE CACHINA

Todas las levaduras aisladas fueron sometidas a diversas pruebas para caracterizarlas desde el punto de vista morfológico y fisiológico.

El resumen completo de estos ensayos se muestra en la Tabla 5. Se observa la descripción morfológica de la colonia, de la forma celular y el comportamiento en medio líquido, de cada cepa aislada de muestras de Cachinas, mosto de Uva Italia, mosto de uva Quebranta y mosto de uva Uvina respectivamente. Todas las cepas de levaduras crecieron óptimamente en medio YPG pH 5,5. Las colonias de las especies de *Kloeckera apiculata* (*Hanseniaspora uvarum*) son generalmente de tamaño grande con diámetro de hasta 5mm, blancas cremosas y brillosas a las 72 horas de incubación a 30°C (Figura 2). Microscópicamente son oval alargadas y/o apiculadas y en medio líquido crecen formando una película gruesa en la pared del tubo de prueba. Entre las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* hay un patrón mas variado en el tipo de crecimiento de la colonia, sin embargo la mayoría muestra colonias con 3-4 mm de tamaño (72 horas de incubación a 30°C), textura aterciopelada y elevadas (Figura 3). Todas las especies de *Saccharomyces* resultaron de forma celular ovaladas y/o redondas cuando fueron coloreadas con la técnica de Tinción Gram (Figura 4), en medio de cultivo líquido YPG pH 5,5 crecen como un sedimento blanco lechoso en el fondo del tubo sin turbidez, sin película, demostrando capacidad de sedimentación.

Los cultivos puros fueron caracterizados fisiológicamente y los resultados de las pruebas de esporulación, formación de pseudomicelio, producción de ureasa y asimilación de nitrato de potasio. En todas las levaduras *Saccharomyces* se observó esporulación con la aparición de tétradas típicas de *S. cerevisiae* con la formación de ascas con 3 a 4 ascosporas redondas y ovaladas (Figura 5). Por otro lado, las cepas *Candida sp.* 1CB y *Candida sp.* 1CB.1 (aisladas de mosto de uva con un día de fermentación), resultaron positivas a la formación de pseudomicelio, ya que fisiológicamente tienen capacidad para utilizar el almidón del medio de cultivo y desarrollarse mediante pseudomicelios (Figura 6). Ninguna de las levaduras evaluadas creció en presencia de nitrato de potasio como única fuente de nitrógeno ni hidrolizaron la urea.

En la Tabla 5, se muestra los resultados de las pruebas de asimilación y fermentación de carbohidratos tales como glucosa, galactosa, lactosa, maltosa, rafinosa y sacarosa. Las especies de *Saccharomyces cerevisiae* asimilaron y fermentaron todos los carbohidratos ensayados a excepción de la lactosa. La mayoría de cepas de *S. cerevisiae* asimilaron muy bien el oligosacárido rafinosa pero lo fermentaron débilmente. Además, las cepas de *Saccharomyces sp.* 4CA, 4CA.1, 7CA, 7CA.1, 7CB, 7CB.1, 7CC y LI.7.1 no asimilaron ni fermentaron el monosacárido galactosa.

Las especies identificadas como *Kloeckera apiculata* asimilan y fermentan débilmente la glucosa, no poseen las herramientas enzimáticas para reaccionar con los otros carbohidratos dando resultados negativos.

4.3 PRESELECCIÓN DE LEVADURAS AISLADAS:

Una vez analizados los resultados de la caracterización de las cepas levaduriformes y con el fin de simplificar el proceso de selección, se procedió a realizar una preselección de las 88 cepas basándose en los resultados del metabolismo fermentativo. La producción de anhídrido carbónico (CO₂) se determinó por un método indirecto que consistió en medir la elevación de la capa vaspar (vaselina-parafina) colocado en la superficie de los tubos sembrados en medios de fermentación conteniendo diferentes carbohidratos (Tabla 6).

4.4 PRUEBAS DE SELECCIÓN DE LEVADURAS

4.4.1 Tolerancia a altas concentraciones de etanol

17 cepas de *S. cerevisiae* asociadas a Cachina fueron evaluadas de acuerdo a su capacidad de crecimiento en medio líquido YPG pH 5.5 conteniendo etanol. La tabla 7, registra las medidas de la densidad óptica (D.O.) a 595 nm de longitud de onda, cada 4 horas para 0, 4, 8, 10 y 12% v/v de etanol.

El 100% (17) de las cepas mostraron buen crecimiento en el medio de cultivo conteniendo etanol a concentraciones de 4 y 8%. 14 (82%) cepas mostraron tolerar significativamente concentraciones de 10% v/v a las 48h. A 12% de etanol, la cepa *S.*

cerevisiae 5CA mostró una D.O. de 0.381 a las 48h. (D.O. inicial 0h= 0.093) y la cepa *S. cerevisiae* 1Qc.3 fue capaz de lograr D. O. de 0.756 a las 48h mostrando una tolerancia significativa a concentraciones altas de etanol (Figuras 7 y 8).

4.4.2 Tolerancia a altas concentraciones de glucosa

El estudio se realizó en caldo YPG pH 5.5 conteniendo el carbohidrato glucosa a diferentes concentraciones 10, 15, 20 y 25% w/v., a partir de la D.O inicial de 0.1 a 540 nm de longitud de onda.

Las cepas seleccionadas mostraron la capacidad de utilizar todas las concentraciones de azúcar (al obtener la D.O.> 1 después de las 48 h.) en las evaluaciones del crecimiento celular (Tabla 8).

De las 17 cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, las cepas 2CA.1, 8CA, 1Qc.3, QLh, y QLi registraron mayor velocidad de crecimiento en 20% (p/v) de glucosa, en cambio las cepas LI.4, QLe, ULb, UL3.1 en 15%, las cepas restantes mostraron mayor densidad solo hasta 10% de glucosa.

La cepa *Saccharomyces cerevisiae* 1Qc.3 registro mayor crecimiento celular que las otras cepas en un medio liquido con 20% de glucosa (Figuras 9 y 10).

4.4.3 Determinación del Factor killer

Las cepas *Saccharomyces cerevisiae* P453 (sensible) y la cepa *Saccharomyces cerevisiae* YAT 674 K1 donadas por M. Sangorrín (U.N. Comahue- Argentina) fueron usadas como cepas control negativo y positivo para determinar la actividad killer de las cepas de levaduras nativas seleccionadas a partir de cachina.

De 17 cepas *S. cerevisiae* preseleccionadas en base a su capacidad fermentativa y tolerancia a altas concentraciones de etanol y glucosa, 6 cepas (35%) mostraron actividad killer frente a cepas autóctonas taxonómicamente afines. Las cepas *S. cerevisiae* 2CA.1 (aislada de Cachina Uvina de 15 días de fermentación) y 12CA 1 (aislada de Cachina Uvina de 20 días de fermentación), mostraron mayor espectro antimicrobiano. En las condiciones ensayadas 10 cepas (59%) presentaron el fenotipo

sensible. De las especies de *Sacchromyces cerevisiae* evaluadas solamente una cepa, *Saccharomyces cerevisiae* 8CA presento el fenotipo neutro, es decir no produce la toxina killer y a la vez no se deja matar por las toxinas de las otras cepas (Tablas 9 y 10, Figuras 11 y 12).

4.4.4 Crecimiento a distintas concentraciones de anhídrido sulfuroso (SO₂)

El análisis de la resistencia de cepas de levaduras al anhídrido sulfuroso se muestra en la Tabla 11. Todas las levaduras crecen en medio liquido YPG con 100 mg/l de SO₂ total. El 44% crecen muy bien en 200 mg/l de SO₂ total a las 24 horas de crecimiento. En 300mg/l de SO₂, mayor concentración evaluada, las cepas *S. cerevisiae* 2CA.1, 10CA, 1Qc.3 y LI.4 lograron buen crecimiento registrando densidad óptica mayor que 1, a las 24 horas de incubación.

TABLAS

Tabla 1.- Enumeración e Identificación de las especies de levaduras aisladas de Cachina:

Muestra	Tiempo de fermentación	Células por ml	Especies aisladas (N° de cepas identificadas)
Cachina de Uva quebranta	1 día	2×10^7	<i>Kloeckera apiculata</i> (2)
		5×10^6	<i>Candida sp.</i> (2)
Cachina de uva Uvina	6 días	1.4×10^8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (2)
Cachina de uva Moscatel	6 días	1.4×10^9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (2)
Cachina de uva Uvina	9 días	2.8×10^8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (2)
Cachina de uva Borgoña	9 días	3.6×10^8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (2)
Cachina de uva Borgoña Blanca	15 días	N.D.	<i>Saccharomyces sp.</i> (2)
Cachina de uva Uvina	15 días	$2,4 \times 10^7$	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (2)
Cachina acholada	15 días	7.9×10^7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (2)
Cachina de uva Uvina	20 días	2.1×10^6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (3)
Cachina de Uva Borgoña Blanca	30 días	7.6×10^4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (4) <i>Saccharomyces sp</i> (2)
Total			27

N.D: No determinado

Tabla 2.- Enumeración y Sucesión Ecológica de las levaduras aisladas de Cachina:

Muestra	Tiempo de fermentación	Células por ml	Cepa (Nº de cepas)
Cachina de Uva Italia	6 días	1.5×10^9	<i>Kloeckera apiculata</i> (3)
			<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (2)
	15 días	1.7×10^5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (3)
	25 días	N.D	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (2)
	60 días	N.D.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (4)
Total			14

N.D: No determinado

Tabla 3.- Enumeración y Sucesión Ecológica de las levaduras aisladas de Cachina:

Muestra	Tiempo de fermentación	Células por ml	Cepa (Nº de cepas)
Cachina de Uva Quebranta	1 día	1.8×10^7	<i>Kloeckera apiculata</i> (6)
		1.3×10^7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (5)
	7 días	3×10^6	<i>Kloeckera apiculata</i> (3)
		9×10^7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (1)
	14 días	3.1×10^7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (3)
	21 días	1.0×10^7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (3)
	28 días	1.9×10^7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (3)
	40 días	5.5×10^6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (4)
Total			28

Tabla 4.- Enumeración y Sucesión Ecológica de las levaduras aisladas de Cachina:

Muestra	Tiempo de fermentación	Células por ml	Cepa (N° de cepas)
Cachina de Uva Uvina	1 día	4.8×10^8	<i>Kloeckera apiculata</i> (4)
		1.9×10^8	<i>Saccharomyces sp</i> (4)
	7 días	2.0×10^6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (2)
		1.0×10^6	<i>Kloeckera apiculata</i> (2)
	14 días	3.0×10^7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (2)
		2.0×10^6	<i>Saccharomyces sp</i> (2)
	20 días	6.1×10^6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (3)
Total			19

Tabla 5.- Características fenotípicas diferenciales de las especies de levaduras aisladas de Cachina

Características	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 63,6% (56)	<i>Kloeckera Apiculata</i> 22,7% (20)	<i>Saccharomyces sp.</i> 11,4% (10)	<i>Candida sp.</i> 2.3% (2)
<i>Morfología celular</i>	Ovoidal, redonda, yema polar y lateral	Elípticas, ahusadas, yema bipolar	Ovoidal, yema polar	Ovoidal, yema polar
<i>Morfología de la Colonia</i>	Redonda, borde liso, blanca, mamelonada aterciopelada.	Redonda, borde liso, cremosa, brillante	Redonda, borde liso, blanca, ligeramente brillante	Redonda, blanca mantecillosa, borde liso, brillante.
<i>Comportamiento en caldo</i>	Sedimento blanco, sin turbidez.	Sedimento blanco regular, sin turbidez, velo en la superficie	Sedimento blanco, sin turbidez.	Sedimento blanco, sin turbidez.
<i>Asimilación de carbohidratos:</i>				
Galactosa	+	-	-	D
Glucosa	+	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-
Maltosa	+	-	+	-
Sacarosa	+	-	+	D
Rafinosa	+	-	+	-
<i>Fermentación de carbohidratos:</i>				
Galactosa	AG	-	-	-
Glucosa	AG	AG	AG	AG
Lactosa	-	-	-	-
Maltosa	AG	-	AG	-
Sacarosa	AG	-	AG	AG
Rafinosa	AG	-	Gd	Gd
<i>Ureasa</i>	-	-	-	-
<i>KNO3</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomicelio</i>	-	-	-	+
<i>Esporulación</i>	+	-	-	-

+: Reacción Positiva

-: Reacción negativa

d: Reacción débil

AG : Acidez y Gas

Tabla 6.- Cepas preseleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae*

Fuente/ Muestra	Tiempo de Fermentación	Código de la cepa	Especie identificada
Cachina Uvina	15 días	2CA.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Cachina Acholada	15 días	3CA.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Cachina Borgoña blanca	15 días	4CA	<i>Saccharomyces cerevisiae.</i>
Cachina Uvina	6 días	5CA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Cachina Borgoña blanca	30 días	7CA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Cachina Borgoña blanca	30 días	7CB	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Cachina Borgoña	9 días	8CA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Cachina Uvina	9 días	10CA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Cachina Uvina	20 días	12CA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Cachina Italia	6 días	LI.4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Cachina Quebranta	1 día	1Qc.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Cachina Quebranta	21 días	QLe	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Cachina Quebranta	40 días	QLh	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Cachina Quebranta	40 días	QLi	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Cachina Uvina	7 días	ULb	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Cachina Uvina	20 días	UL2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Cachina Uvina	20 días	UL3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Tabla 7.- Crecimiento de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPG con diferentes concentraciones de etanol.

Cepa	%Etanol	D.O. a 540 nm con respecto al tiempo (h)					
		0	4	8	12	24	48
2CA.1	0	0,104	0,277	0,846	1,226	1,45	1,408
	4	0,1	0,177	0,578	1,036	1,41	1,395
	8	0,1	0,108	0,188	0,341	1,089	1,273
	10	0,09	0,096	0,127	0,155	0,34	1,059
	12	0,09	0,092	0,102	0,104	0,107	0,115
3CA.1	0	0,101	0,182	0,711	1,065	1,344	1,251
	4	0,102	0,142	0,582	0,943	1,289	1,24
	8	0,101	0,13	0,226	0,415	1,16	1,228
	10	0,098	0,121	0,154	0,167	0,337	1,076
	12	0,096	0,098	0,101	0,107	0,107	0,102
4CA	0	0,105	0,172	0,549	1,013	1,389	1,394
	4	0,108	0,145	0,488	0,909	1,346	1,329
	8	0,106	0,109	0,196	0,327	0,92	1,232
	10	0,105	0,107	0,113	0,154	0,239	0,852
	12	0,098	0,101	0,105	0,107	0,101	0,092
5CA	0	0,101	0,368	0,825	1,102	1,4	1,357
	4	0,092	0,238	0,7	1,028	1,318	1,331
	8	0,089	0,16	0,423	0,737	1,271	1,31
	10	0,085	0,149	0,16	0,181	0,66	1,23
	12	0,083	0,101	0,112	0,12	0,132	0,381
7CA	0	0,109	0,283	0,72	1,119	1,393	1,42
	4	0,105	0,21	0,525	0,945	1,315	1,33
	8	0,118	0,149	0,291	0,51	1,157	1,285
	10	0,108	0,126	0,21	0,244	0,703	1,133
	12	0,105	0,119	0,132	0,14	0,115	0,113
7CB	0	0,104	0,148	0,28	0,659	1,345	1,31
	4	0,101	0,109	0,228	0,545	1,199	1,2
	8	0,098	0,101	0,109	0,144	0,246	0,471
	10	0,099	0,103	0,106	0,114	0,115	0,121
	12	0,096	0,098	0,102	0,106	0,108	0,098
8CA	0	0,105	0,257	0,84	1,223	1,335	1,324
	4	0,106	0,191	0,623	1,108	1,281	1,285
	8	0,103	0,133	0,36	0,533	1,222	1,224
	10	0,103	0,127	0,17	0,291	0,676	1,062
	12	0,104	0,12	0,151	0,148	0,154	0,166
10CA	0	0,11	0,237	0,88	1,245	1,392	1,379
	4	0,103	0,188	0,69	1,12	1,353	1,36
	8	0,108	0,153	0,273	0,544	1,171	1,336
	10	0,105	0,148	0,204	0,271	0,703	1,262
	12	0,102	0,11	0,133	0,126	0,117	0,11
12CA	0	0,1	0,258	0,655	1,066	1,527	1,534
	4	0,099	0,194	0,406	0,886	1,468	1,48
	8	0,096	0,114	0,198	0,416	1,222	1,451
	10	0,093	0,099	0,118	0,197	0,509	1,005
	12	0,09	0,065	0,102	0,112	0,117	0,113

Continuación.....

Tabla 7. Crecimiento de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPG con diferentes concentraciones de etanol.

Cepa	%Etanol	D.O. a 540 nm con respecto al tiempo (h)					
		0	4	8	12	24	48
1Qc.3	0	0,119	0,455	0,98	1,316	1,48	1,465
	4	0,103	0,403	0,857	1,124	1,455	1,427
	8	0,108	0,256	0,512	0,704	1,38	1,385
	10	0,107	0,161	0,222	0,324	0,895	1,337
	12	0,101	0,142	0,162	0,167	0,244	0,756
LI.4	0	0,1	0,324	0,872	1,226	1,367	1,376
	4	0,098	0,263	0,724	1,114	1,324	1,32
	8	0,103	0,205	0,308	0,558	1,226	1,21
	10	0,099	0,174	0,225	0,247	0,762	1,145
	12	0,097	0,115	0,118	0,101	0,109	0,13
QLe	0	0,11	0,281	0,945	1,297	1,451	1,43
	4	0,1	0,205	0,755	1,118	1,45	1,447
	8	0,103	0,14	0,34	0,526	1,301	1,328
	10	0,106	0,157	0,186	0,251	0,701	1,214
	12	0,09	0,119	0,113	0,119	0,119	0,105
QLh	0	0,115	0,267	0,994	1,369	1,49	1,46
	4	0,112	0,198	0,63	0,96	1,51	1,474
	8	0,13	0,166	0,302	0,46	1,2	1,289
	10	0,117	0,16	0,191	0,232	0,69	1,153
	12	0,1	0,152	0,126	0,109	0,112	0,105
QLi	0	0,118	0,32	0,889	1,171	1,46	1,461
	4	0,113	0,242	0,668	1,026	1,405	1,432
	8	0,112	0,183	0,472	0,8	1,33	1,372
	10	0,112	0,124	0,159	0,22	0,609	1,215
	12	0,114	0,119	0,13	0,136	0,139	0,25
ULb	0	0,117	0,252	0,999	1,363	1,415	1,419
	4	0,113	0,194	0,661	1,138	1,401	1,396
	8	0,108	0,163	0,303	0,485	1,225	1,299
	10	0,105	0,143	0,165	0,23	0,71	1,18
	12	0,101	0,13	0,128	0,127	0,126	0,117
UL3	0	0,105	0,253	0,572	1,203	1,314	1,342
	4	0,105	0,211	0,525	0,967	1,135	1,143
	8	0,108	0,136	0,299	0,651	1,127	1,135
	10	0,102	0,122	0,321	0,349	0,808	1,112
	12	0,101	0,109	0,112	0,114	0,115	0,113
UL2	0	0,104	0,237	0,684	1,153	1,255	1,337
	4	0,102	0,221	0,523	1,008	1,191	1,28
	8	0,103	0,133	0,366	0,533	0,876	1,094
	10	0,103	0,117	0,247	0,391	0,776	1,002
	12	0,102	0,128	0,152	0,128	0,134	0,156

Tabla 8.- Crecimiento de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPG con diferentes concentraciones de azúcar.

Cepa	% Glucosa	D.O. a 540 nm con respecto al tiempo (h)					
		0	4	8	12	24	48
2CA.1	10	0,109	0,264	0,837	1,249	1,812	1,921
	15	0,101	0,222	0,776	1,188	1,914	2,038
	20	0,102	0,196	0,7	1,139	1,972	2,142
	25	0,109	0,14	0,545	0,916	1,46	1,789
3CA.1	10	0,11	0,2	0,81	1,147	1,586	1,741
	15	0,099	0,192	0,733	1,086	1,526	1,707
	20	0,09	0,175	0,672	1,052	1,509	1,654
	25	0,113	0,16	0,413	0,827	1,418	1,58
4CA	10	0,112	0,156	0,547	1,11	1,94	1,941
	15	0,112	0,154	0,64	0,959	1,7	1,83
	20	0,099	0,128	0,47	0,917	1,525	1,646
	25	0,11	0,116	0,457	0,83	1,453	1,692
5CA	10	0,11	0,49	0,99	1,317	2,158	2,185
	15	0,104	0,445	1,01	1,163	1,758	1,967
	20	0,108	0,424	0,926	1,087	1,588	1,69
	25	0,11	0,417	0,804	1,08	1,513	1,753
7CA	10	0,093	0,128	0,58	0,98	1,584	1,832
	15	0,096	0,126	0,485	0,936	1,553	1,742
	20	0,106	0,131	0,424	0,85	1,496	1,78
	25	0,099	0,116	0,28	0,669	1,415	1,59
7CB	10	0,105	0,124	0,312	0,709	1,397	1,834
	15	0,102	0,127	0,306	0,708	1,339	1,566
	20	0,11	0,133	0,338	0,666	1,38	1,6
	25	0,094	0,113	0,258	0,575	1,11	1,33
8CA	10	0,102	0,213	0,94	1,37	1,727	1,777
	15	0,113	0,184	0,83	1,19	1,597	1,74
	20	0,1	0,168	0,65	1,118	1,815	2,034
	25	0,11	0,152	0,475	0,93	1,479	1,698
10CA	10	0,105	0,249	0,828	1,201	1,748	1,814
	15	0,1	0,219	0,764	1,152	1,672	1,78
	20	0,1	0,127	0,561	0,95	1,577	1,71
	25	0,113	0,152	0,394	0,732	1,491	1,66
12CA	10	0,107	0,225	0,657	1,058	1,725	1,826
	15	0,108	0,192	0,583	1,033	1,649	1,775
	20	0,108	0,128	0,508	0,983	1,711	1,76
	25	0,105	0,125	0,397	0,84	1,52	1,8

Continuación...

Tabla 8.- Crecimiento de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPG con diferentes concentraciones de azúcar.

Cepa	%Glucosa	D.O. a 540 nm con respecto al tiempo (h)					
		0	4	8	12	24	48
1Qc.3	10	0,112	0,38	0,83	1,353	1,762	1,815
	15	0,1	0,3	0,82	1,23	1,759	1,9
	20	0,096	0,26	0,72	1,143	2,052	2,24
	25	0,099	0,19	0,54	0,873	1,407	1,545
LI.4	10	0,11	0,208	0,779	1,191	1,845	1,88
	15	0,108	0,164	0,653	1,067	1,96	2,001
	20	0,102	0,177	0,678	1,03	1,499	1,668
	25	0,113	0,172	0,674	0,952	1,458	1,661
QLe	10	0,106	0,205	0,858	1,396	1,776	1,82
	15	0,107	0,159	0,775	1,07	1,85	2,026
	20	0,102	0,172	0,79	1,326	1,62	1,834
	25	0,105	0,132	0,636	0,93	1,55	1,72
QLh	10	0,1	0,135	0,799	1,3	1,848	1,869
	15	0,105	0,162	0,749	1,253	1,701	1,9
	20	0,105	0,136	0,669	1,097	1,909	2,204
	25	0,11	0,15	0,626	0,981	1,62	2,063
QLi	10	0,105	0,278	0,865	1,269	1,726	1,916
	15	0,1	0,211	0,795	1,228	1,674	1,853
	20	0,102	0,182	0,728	1,14	1,654	2,237
	25	0,096	0,125	0,555	0,918	1,513	1,772
ULb	10	0,106	0,144	0,802	1,283	1,823	1,899
	15	0,1	0,145	0,773	1,156	1,77	1,969
	20	0,108	0,149	0,735	1,233	1,584	1,792
	25	0,098	0,153	0,73	1,115	1,534	1,759
UL3	10	0,103	0,118	0,448	0,898	1,514	1,632
	15	0,106	0,126	0,475	0,916	1,653	1,742
	20	0,106	0,121	0,424	0,655	1,506	1,718
	25	0,103	0,111	0,284	0,469	1,315	1,509
UL2	10	0,102	0,164	0,702	1,201	1,693	1,859
	15	0,102	0,145	0,673	1,112	1,377	1,658
	20	0,101	0,129	0,635	1,103	1,584	1,592
	25	0,099	0,12	0,573	0,675	1,134	1,268

Tabla 9.- Espectro inhibitorio del factor killer de *Saccharomyces cerevisiae* frente a cepas taxonómicamente afines, aisladas de Cachina.*

Cepas product.	Cepas sensibles									
	Diámetro de inhibición (mm)									
	1Qc.3	2CA.1	3CA.1	7CA	7CB	8CA	10CA	12CA	QLh	ULb
1Qc.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2CA.1	14	-	-	18	16	-	10	-	13	11
3CA.1	11	-	-	16	16	-	7	-	13	11
7CA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7CB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8CA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10CA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12CA	15	-	-	16	18	-	9	-	15	13
QLh	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ULb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Se registra la lectura a las 72 horas. La lectura se realiza midiendo el halo total (colonia+halo transparente+ halo azul).

Tabla 10.- Espectro inhibitorio del factor killer de *Saccharomyces cerevisiae* frente a cepas taxonómicamente afines, aisladas de Cachina.*

Cepas product.	Cepas sensibles								
	Diámetro de inhibición (mm)								
	1Uc.1	4CA	5CA	LI.4	Qle	QLi	UL2	UL3.1	P453
4CA	-	-	-	-	11	11	11	12	12
5CA	-	-	-	-	13	11	12	13	12
LI.4	-	-	-	-	13	11	12	13	13
Qle	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QLi	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UL2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UL3.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
YAT 674	-	-	-	-	11	11	11	12	10
K1									

* Se registra la lectura a las 72 horas. La lectura se realiza midiendo el halo total (colonia+halo transparente+ halo azul).

Tabla 11.- Resistencia de las cepas nativas de *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes concentraciones de anhídrido sulfuroso SO₂

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100mg/L	200mg/L	300mg/L
2CA.1	+++	+++	++
3CA.1	+++	++	-
4CA	+++	+++	-
5CA	+++	+++	++
7CA	+++	++	++
7CB	+++	++	-
8CA	+++	++	++
10CA	+++	++	-
12CA	+++	++	-
1QC.3	+++	+++	++
LI.4	+++	+++	++
QLe	+++	++	++
QLh	+++	+++	++
QLi	+++	+++	-
ULb	+++	++	-
UL3.1	+++	++	-
UL2	+++	++	-

+++ : Crece a D.O. (560nm) > 1 a las 24 h.

++ : Crece a D.O. (560nm) > 1 a las 48 h.

- : No crece a D.O. (560nm) > 1

Tabla 12.- Resumen de las propiedades fisiológicas de las levaduras evaluadas

Código de la cepa	Especie identificada	Tolerancia al etanol	tolerancia al azúcar	Tolerancia a SO ₂	Fenotipo killer
2CA.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10%	20%	300mg/L	K+
3CA.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10%	10%	200mg/L	K+
4CA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8%	10%	200mg/L	K+
5CA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10%	10%	300mg/L	K+
7CA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10%	10%	300mg/L	Sensible
7CB	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10%	10%	200mg/L	Sensible
8CA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10%	20%	300mg/L	Neutro
10CA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10%	10%	200mg/L	Sensible
12CA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10%	10%	200mg/L	K+
LI.4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10%	15%	300mg/L	K+
1Qc.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10%	20%	300mg/L	Sensible
QLe	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10%	15%	300mg/L	Sensible
QLh	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10%	20%	300mg/L	Sensible
QLi	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10%	20%	200mg/L	Sensible
ULb	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10%	15%	200mg/L	Sensible
UL2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10%	10%	200mg/L	Sensible
UL3.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10%	15%	200mg/L	Sensible

FIGURAS

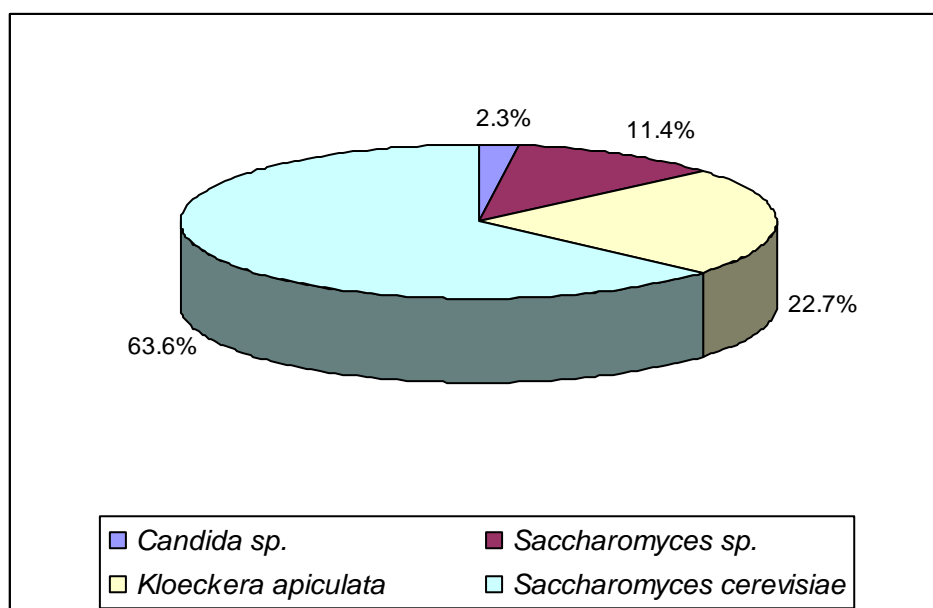


Fig. 1.- Distribución porcentual de cepas nativas de levaduras aisladas de Cachina, del distrito de Lunahuaná-Lima.



Fig. 2.- Morfología de la colonia de *Kloeckera apiculata* 1CA



Fig. 3.- Morfología de la colonia de *Saccharomyces cerevisiae* QLi



Fig. 4.- Morfología celular de levaduras nativas de *Saccharomyces cerevisiae*

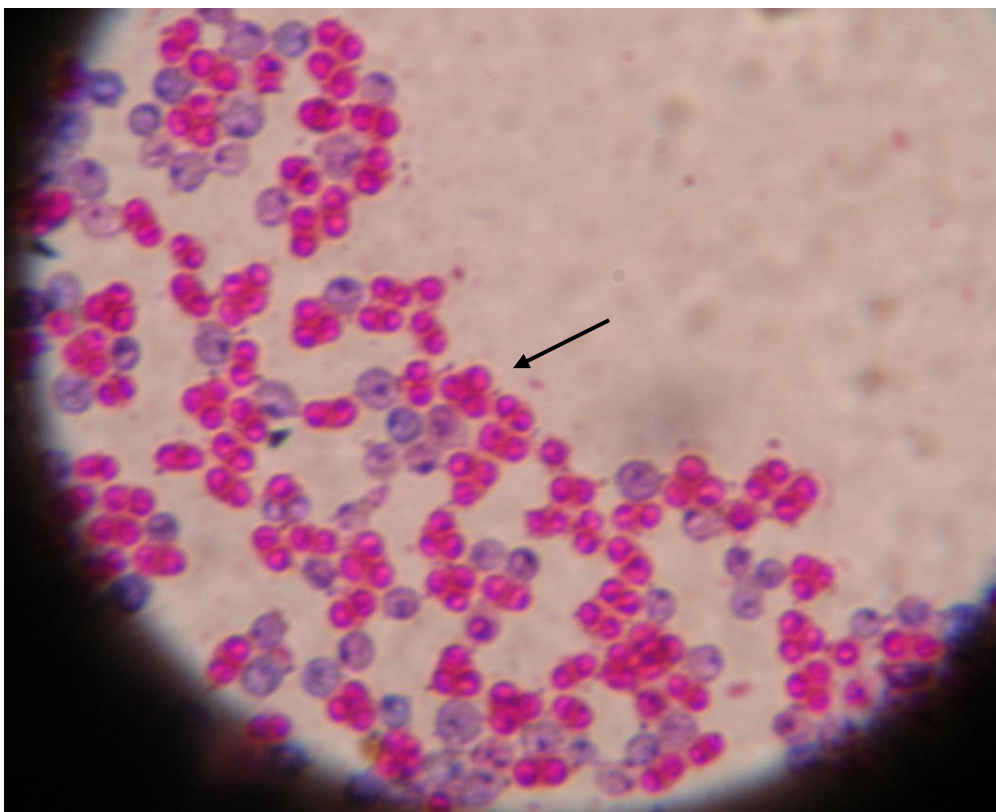


Fig. 5.-Ascosporas de *Saccharomyces cerevisiae* 2CA.1 en medio Agar Acetato pH 8.0

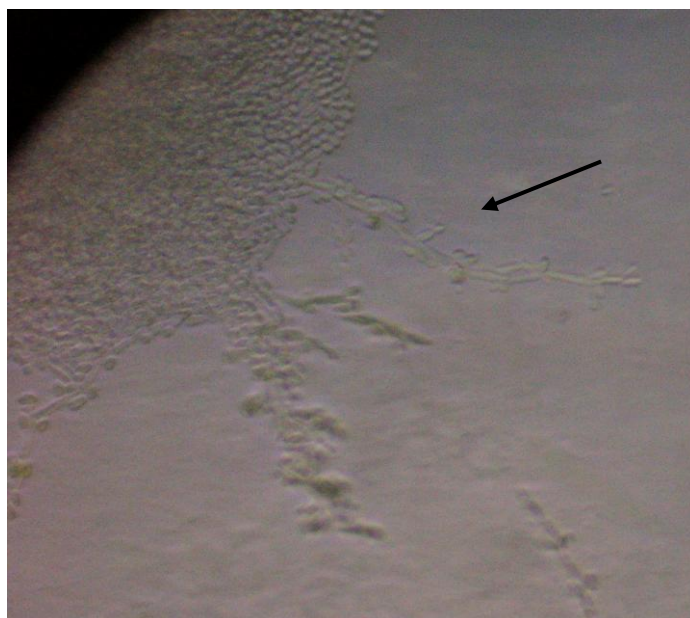


Fig. 6.- Pseudomicelio de *Candida* sp. 1CB en Agar Arroz Almidón pH 6.5

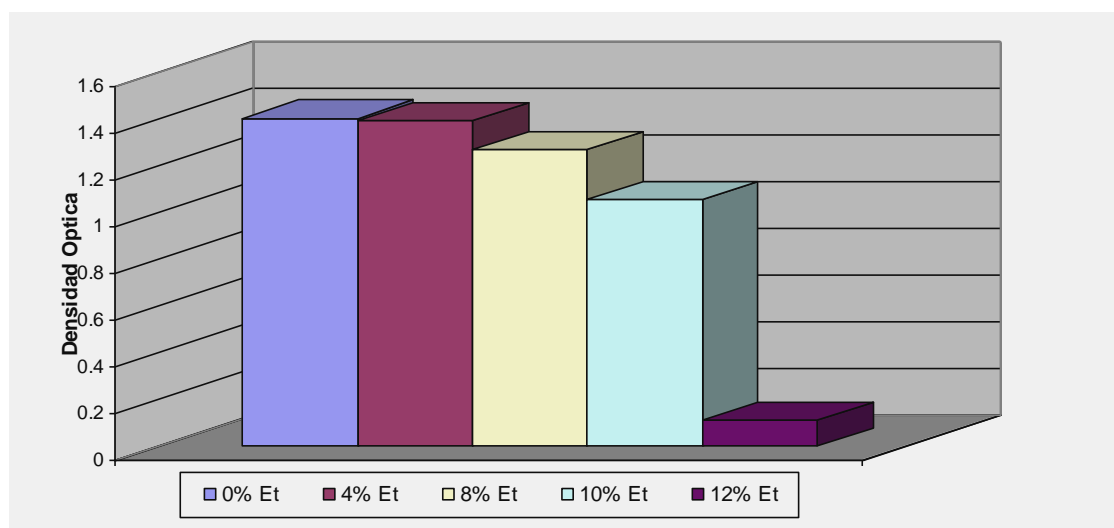


Fig. 7.- Evaluación de la tolerancia al etanol en el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* 2CA.1

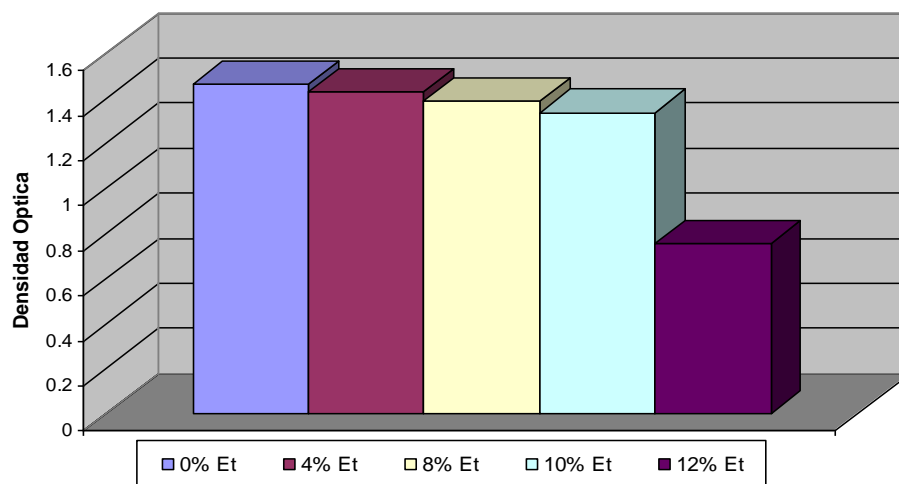


Fig. 8.- Evaluación de la tolerancia al etanol en el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* 1Qc.3

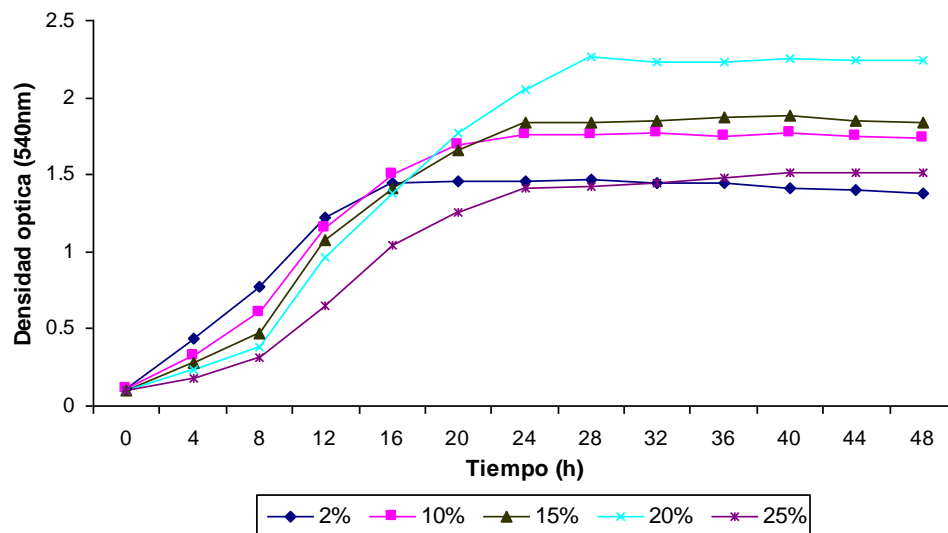


Fig. 9.- Curva de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* 1Qc.3 en concentraciones incrementadas de glucosa (% p/v)

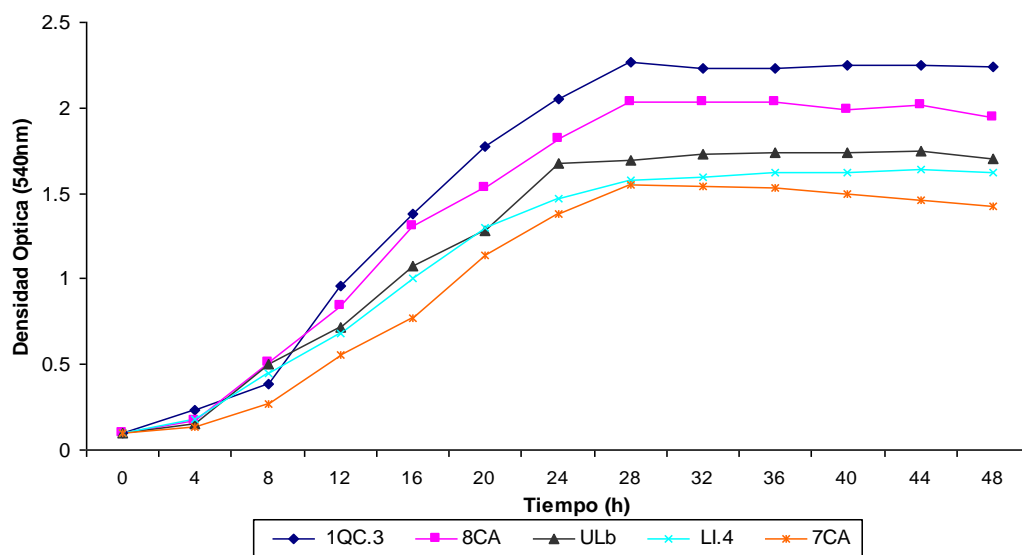


Fig. 10.- Curvas de crecimiento de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en Glucosa 20% (p/v)

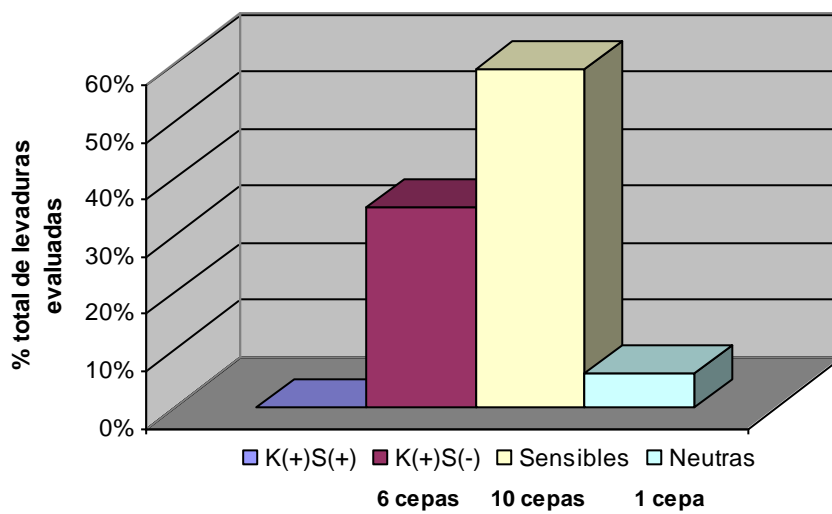


Fig. 11.- Comportamiento Killer de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* evaluadas.

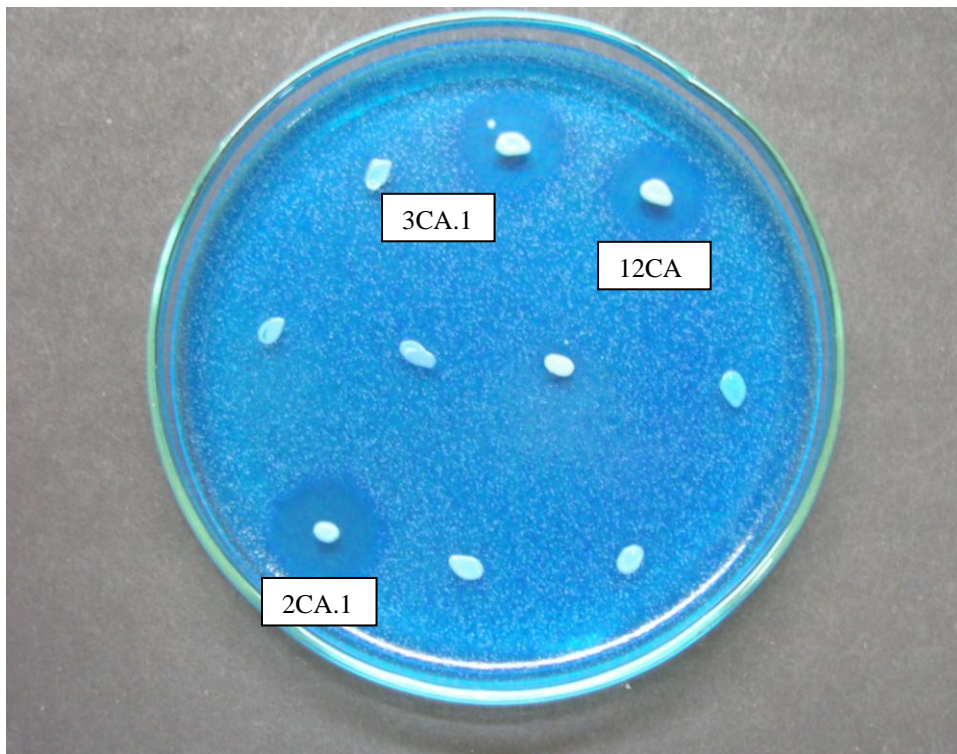


Fig. 12.- Inhibición del crecimiento causada por toxina killer de tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae* 2CA.1, 3CA.1 Y 12CA en agar YEPD-MB previamente sembrada con la cepa sensible de *S. cerevisiae* 7CA.

V. DISCUSION

De un total de 88 cepas de levaduras aisladas de mostos de uvas en proceso de fermentación, el mayor porcentaje correspondió a la especie *Saccharomyces cerevisiae* y en menor porcentaje a *Kloeckera apiculata* y *Candida sp.* Estos resultados coinciden con lo descrito por Ethiraj S. et al, (1980); Fleet et al. , (1984); Querol *et al.*, (1990); Poblet, M. *et al.*, (1992); Fleet y Heard, (1993); Schütz y Gafner, (1993); Capello et al., (2004); Satora et al, (2005); sin embargo al inicio de la fermentación de los mostos también suelen estar presentes *Metschnikowia*, *Pichia*, *Kluyveromyces* y *Rhodotorula*, las cuales no se encontraron en las muestras en estudio.

Los resultados cuantitativos realizados en el presente estudio, mostraron un desarrollo secuencial de las especies de levaduras durante la fermentación espontánea de la Cachina y se pudo observar que al inicio del proceso de fermentación predominaba levaduras apiculadas como *Kloeckera apiculata*, forma imperfecta o haploide de *Hanseniaspora uvarum*, seguida de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual domina la fermentación alcohólica a partir del sexto día de fermentación. La variación en los recuentos de estas especies a lo largo de la fermentación se debe a que según se va desarrollando el proceso, la concentración de etanol aumenta en el medio aumenta, lo cual no favorece el desarrollo de *Kloeckera apiculata* y *Candida sp.*, especies de metabolismo principalmente oxidativo y sensibles a concentraciones altas de etanol (Torija, 2004).

La proliferación inicial de las levaduras apiculadas se dio hasta el séptimo día de fermentación, el crecimiento puede afectar la calidad del vino ya que estas cepas de levaduras son conocidas que producen mucha acidez volátil (mas de 1 o 2 g. de ácido acético por litro) por lo que no es deseable en las fermentaciones. La incapacidad de *Kloeckera apiculata* de sobrevivir en los mostos ha sido atribuido a su sensibilidad a concentraciones elevadas de etanol y se puede eliminar fácilmente con el sulfatado, dada su baja resistencia al SO₂ (Mesas y Alegre, 1999).

Además se comprobó que a partir del sexto día, la levadura que comienza a predominar fue *Saccharomyces*. La capacidad de cepas de *Saccharomyces* para crecer en los mostos y transformarlos en vino se sostiene en que su poder alcohológeno es elevado y es resistente al SO₂ y sugiere que esta levadura realiza una gran contribución a la ecología de la fermentación y finalmente le otorga características particulares a la bebida. Este resultado coincide con los estudios de Torija (2004).

Como la gran mayoría de cepas fueron identificadas como *Saccharomyces cerevisiae*, se puede afirmar que esta levadura fermentativa por excelencia, es la especie responsable de la fermentación en los mostos de cachina. Esta afirmación coincide con las observaciones de otros autores (Suarez e Iñigo, 1992; Querol et al., 1992; Fleet y Heard, 1993; Regodón et al., 1997).

Todas las cepas de levaduras preseleccionadas mostraron tolerancia a concentraciones altas de etanol contenido en el medio de cultivo, siendo la cepa *S. cerevisiae* 1Qc.3, la cepa que mostro mejor crecimiento. Todas las cepas de levaduras utilizadas como controles fueron sembradas en caldo YPG pH 5.5 libre de etanol. El crecimiento de las cepas 10CA, QLe, QLh y ULb fueron suplementado con 4% de etanol, debido a la capacidad de éstas de utilizar bajas concentraciones de etanol como fuente de carbono. Este hallazgo coincide con las observaciones de Alegría et al., (2004) quienes reportaron el mismo efecto pero con 7% de etanol (v/v) en el caldo de cultivo para cepas de *Lactobacillus plantarum*. Las 17 cepas nativas preseleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae* no fueron inhibidas hasta en 10% de etanol contenido en el medio de cultivo, lo cual revela la tolerancia bastante significativa, lo que indica que la tolerancia al etanol depende de las cepas levaduriformes.

El etanol afecta a la permeabilidad de la membrana celular disminuyendo su selectividad, de tal forma que las levaduras en un medio con alta concentración alcohólica pierden sus propiedades funcionales y no pueden retener cofactores y coenzima. (Alexandre et al., 1994). El etanol parece sobretodo acelerar el influjo pasivo de protones del mosto hacia el interior de la célula (Juroszek et al., 1987). Para mantener el pH intracitoplasmático próximo a la neutralidad, la *S. cerevisiae* debe activar su ATPasa membranar (bomba de protones), actividad consumidora de energía y en sí mismo sensible al etanol. (Rosa y Sa-correica, 1991. El aumento de la

permeabilidad membranar puede, por tanto, tener múltiples consecuencias y conducir a una fuerte reducción de la viabilidad celular. Concentraciones altas (10%) alteran ciertas actividades enzimáticas de la vía glicolítica, concretamente la hexoquinasa y la glicerol 4 fosfato deshidrogenada, sin embargo las cepas de levaduras en estudio fueron alcohol tolerantes, pero a 12% de etanol, la mayoría de cepas disminuyeron su viabilidad.

Por otro lado, todas las cepas de levaduras alcohol tolerantes, fueron además capaces de crecer en un medio conteniendo concentraciones altas de azúcar glucosa (10%, 15%, 20% y 25%). Este resultado está de acuerdo con las observaciones de Gray (1945) quien sostuvo que las levaduras etanol tolerantes tienden a ser también azúcar tolerantes. Ekunsanmi y Odunfa (1990) acertaron que la combinación de tolerancia al azúcar y etanol es una ventaja de la levadura nativa para ser utilizada en la industria vitivinícola.

Las levaduras alcohol tolerantes tienen la capacidad de producir etanol en concentraciones que no afecten la permeabilidad de la pared celular de las cepas. La cepa *S. cerevisiae* 2CA.1 creció obteniendo mayor densidad óptica en medio líquido YPG pH 5.5 conteniendo 20% de glucosa. Esta levadura podría ser utilizada para producir vinos de alto grado alcohólico.

Algunas cepas de *Saccharomyces* y otros géneros, segregan en el medio unos compuestos proteicos conocidas como toxinas killer, los cuales matan a cepas sensibles. Las toxinas killer son activas contra una variedad de diferentes levaduras incluyendo especies del género *Saccharomyces*. La actividad killer puede representar uno de los mecanismos de antagonismo entre levaduras durante fermentaciones espontáneas. De esta forma, el uso de cepas killer de vino podría tener un significado industrial en fermentaciones que requieren un control microbiológico estricto, con una visión en la prevención de la contaminación por cepas de levaduras no deseables. La cepa killer de *S. cerevisiae* produce toxinas killer que matan a cepas con fenotipo sensibles. El fenotipo resistente o neutro está caracterizado por no producir la toxina killer y ser resistente a ella.

Las 17 cepas de *S. cerevisiae* pre-seleccionadas fueron utilizadas para determinar la capacidad de producir la toxina killer. El resultado global mostró que del total de cepas

evaluadas, 10 fueron sensibles, 6 mostraron fenotipo killer y 1 cepa resultó neutra o resistente. Este resultado coincide con los resultados de Cansado et al (1991) quienes revelan que a lo largo de las sucesivas etapas de la fermentación de vinos, el mayor porcentaje correspondió a cepas sensibles, seguidas de cepas killer y en menor porcentaje a cepas de fenotipo neutro. Las cepas killer encontradas en el presente estudio fueron de mosto de uva de 6, 15 y 20 días de fermentación espontánea. La cepa 2CA.1 aislada de Cachina de uva Moscatel de 6 días de fermentación, además de alcohol y azúcar tolerante destacó por mostrar gran actividad inhibitoria contra levaduras de su misma especie, indicando su capacidad killer y su participación activa durante el proceso de bioconversión.

VI. CONCLUSIONES

- Durante la fermentación espontánea de los mostos de diferentes uvas de la región de Lunahuaná, ocurre una sucesión natural de microorganismos y la fermentación es iniciada principalmente por especies de *Kloeckera apiculata*, seguida de *Saccharomyces cerevisiae* hasta el final de la fermentación.
- Se confirma que *Saccharomyces cerevisiae* es la responsable principal de la fermentación alcohólica espontánea de Cachina de las bodegas de Lunahuaná, tal como ocurre en otras regiones vitivinícolas.
- La Cachina es una fuente natural de cepas silvestres de *Saccharomyces cerevisiae* con propiedades benéficas desde el punto de vista biotecnológico y enológico, y pueden ser utilizadas como cultivos iniciadores para producir vinos típicos e inocuos.
- La selección de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* obtenidas en la presente investigación tolera concentraciones altas de etanol (10%), glucosa (20%) y anhídrido sulfuroso (300 mg/l).
- Se ha comprobado que en la bebida tradicional Cachina, existen levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* con fenotipo killer, lo cual le otorga a las cepas una capacidad competitiva adicional frente a otras cepas de carácter sensible.
- La levadura *Saccharomyces cerevisiae* 2CA.1 aislada de mostos de uvas de Lunahuaná, tiene capacidades fisiológicas y biotecnológicas para ser utilizada como cultivo iniciador en la industria del vino, presentan tolerancia a 10% de etanol, crece óptimamente en 20% de glucosa, resiste 300mg/L de SO₂ además de presentar fenotipo killer.

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda indagar más en la búsqueda de otras levaduras nativas de interés industrial en las bebidas tradicionales de nuestro país.
- Se recomienda continuar los estudios biotecnológicos de las cepas seleccionadas para realizar fermentaciones dirigidas y a escala industrial.
- Es recomendable continuar en la preservación de un banco de cepas nativas asociadas a las bebidas tradicionales del Perú.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Achi, O.K. (2005) The potential for upgrading traditional fermented foods through biotechnology. *African Journal of Biotechnology* **4**(5) 375-380

Benítez T., Del Castillo L., Aguilera A., Conde J y Cerdá-Olmedo E. (1983) Selection of wine yeast for growth and fermentation in the presence of ethanol and sucrose. *Applied and Environmental Microbiology* **45**(5) 1429-1436

Bilbao, A., Irastorza, A., Dueñas, M. and Fernández, K. (1997) The effect of temperature on the growth of strains *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* in apple juice fermentation. *Letter in applied and Environmental Microbiology* **48**(5) 1034-1038

Cappello, M.S., Bleve, G., Grieco, F., Dellaglio, F. and Zacheo, G. (2004) Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. *Journal of Applied Microbiology* **97**, 1274-1280.

Cansado j., Longo E., Sieiro, C., Velásquez, J.B. and Villa T.G. (1991) Role of killer character in spontaneous fermentations from NW Spain: ecology, distribution and significance. *Appl. Microbiology and Biotechnology*. **34**, 643-647

Ceccato S.R.; Moreira L.C and Regenfuss C. (1999) “Killer” character of yeast isolated from ethanolic fermentations. *Scientia Agricola*. **56** (3)

Ciani, M., Fatichenti, F. (1999) Selective sugar consumption by apiculate yeasts. *Letters in Applied Microbiology* **28**, 203-206

Chi, Z. and Ameborg, N. (2000) *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance exhibit different adaptive responses to produced ethanol. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology* **24**, 75-78

Combina M. Selección de levaduras nativas para vinificación.

<http://www.inta.gov.ar/mendoza/info/documentos/TemasCEE/CEE008.htm>

Codón A. C., Gasent-Ramirez J. M. and Benítez T. (1995) Factors Vich affect the frecuency of sporulation and tetrad formation in *Saccharomyces cerevisiae* Baker's Yeast. *Applied and Environmental Microbiology* **61**(2), 630-638

Collado, Q. Levaduras y fermentación alcohólica

<http://www.verema.com/opinamos/tribuna/articulos/levaduras02.htm>

Ganga, M. Recolección y Caracterización de cepas autóctonas de levaduras para la diferenciación e identidad organoléptica de los vinos chilenos.

<http://www.conicyt.cl/fondef/bases/fondef/PROYECTO/98/I/D98I1037.HTML>

Gray W.D. (1945). The sugar tolerance of four strains of distillers' yeast. *Journal of Bacteriology*. **49**, 445-452.

Ekunsami T.J. and Odunfa S.A (1990) Ethanol tolerance, sugar tolerance and invertase activities of some yeast strains isolated from steep water of fermenting cassava tubers. *Journal of Applied Bacteriology* **69**, 672-675

Ethiraj S., Onkarayya H. y Suresh R. (1980) A note on the nature and sequence of yeasts during fermentation of apples growth in India. *Journal of Applied Bacteriology* **48**, 97-100

Ezeogu L. I., Emeruka A. C. (1993) High level ethanol-tolerant *Saccharomyces* from Nigerian palm wine. *Biotechnology letters* **15**(1) 83-86

Fleet, G.H., Lafon-Lafourcade, S. and Ribéreau-Gayon, P. (1984) Evolution of Yeast and Lactic Acid Bacteria During Fermentation and Storage of Bordeaux Wines. *Applied and Environmental Microbiology* **48**(5) 1034-1038

Fleet, G.H. y Heard, G.M. (1993) Yeast growth during fermentation. *Wine Microbiology and Biotechnology*. (Ed. G.H. Fleet) pp. 27-54. Harwood Academic Publishers, Switzerland.

Fleet, G. H. (1999) Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Microbiology* **50**, 101-117.

Gil, J.V., Mateo J.J., Jimenez M., Pastor A. Y Huertas T. (1996) Aroma Compounds in Wine as Influenced by Apiculate Yeast. *Journal of Food Science*. **61**(6), 1247-1250.

Gulbiene, G., Kondratienė, L., Jokantaite T., Serviėne, E. Melvydas y Pentkunie G. (2004). Occurrence of Killer Yeast Strains in Fruti and Berry Wine Yeast Populations. *Food Technology Biotechnology*. **42**(3)159-163.

Huertas, V. Lorenzo (2004) Historia de la producci3n de vinos y piscos en el Per3. *Revista Universum (Talca)* **19**(2), 44-61.

Ibarra A., Mendiola J., Cabanillas J., Huallanca D., Chavez G., Garc3a L y Espino F. (2005) Niveles de grado alcoh3lico, acidez total y calidad sensorial de la cachina producida en el valle de Ica (Per3) *Revista de Enolog3a* 53.

Izg3 F.; Altinbay D. and Y3celis A. (1997) Identification and killer activity of a yeast contaminating starter cultures of *saccharomyces cerevisiae* strains used in the turkish baking industry. *Food Microbiology*. 14, 125-131.

Kreger-Van Rij, N.J.W. (1984). *The yeast: A taxonomic study* 4^o ed. Amsterdam. Elsevier Science Publishers.

K3hle, A. Van der Aa y jeperson, L. (1998) Detection and identification of wild yeast in lager breweries. *International Journal of Food Microbiology*. 43:205-213.

Kurtzman CP, Fell JW (1998) *The Yeasts: A Taxonomic Study*.

Longo, E., Cansado, J., Agrelo, D. y Villa, T.G. (1991). Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. *American Journal of Enology*. **42**, 141-144

Martínez A. y Carrascosa A.V. (1999) Selección de cepas de levadura para realizar la segunda fermentación en la elaboración de vinos de cava. Resúmenes de Jornadas Científicas en Zaragoza, 17-19 mayo de 1999.

Morata, A., Calderón F., González, M.C., Varela, F., Colomo., Uthurry C y Suárez J. (1999) Primeros Criterios de Selección de Levaduras para la Vinificación en tinto. Jornadas Científicas 99, realizado del 17-19 de mayo de 1999

Mas A., Torija M. J., Beltrán G., Novo M., Hierro N., Poblet M., Rozés N y Guillamón J.M. (2002) Selección de levaduras. *Tecnología del vino* 39-44

Mesas, J.M.; Alegre, M.T. (1999) El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos* **2**, 174-183

Melero, R. (1992) Fermentación controlada y selección de levaduras vínicas. Rev. Española de Ciencia y Tecnología Alimentaria **32**(4), 371-379

Orlić, S.; Očić, N.; Jeromel, A.; Huić, K.; Redžepović, S. (2005) Selection of Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains from Kutjevo wine growing area at the laboratory scale. *Agriculture Conspectus Scientificus* **70**(3), 93-97

Osho, A. (2005) Ethanol and sugar tolerance of wine yeast isolated from fermenting cashew apple juice. *African Journal of Biotechnology* **4**(7), 660-662

Poblet, M.; Rozés N.; Ruiz, A.; Reguant, C., Beltrán G., Torija, M.A., Guillamón J.M., Bordons, A., Mas, A. (1999) Seguimiento e identificación de los microorganismos presentes durante la elaboración de vinos. *Enología*.

Querol A., Barrio E., Huerta T. y Ramón D. (1992) Dry yeast strain for use in fermentation of Alicante wine: Selection and DNA patterns. *Journal of Food Science*. **57**, 183-185

Ramos, P. Proyecto de ley 3685. Ley que declara de interés nacional el cultivo de la vid y de la producción de uvas y derivados, promoviendo su tecnificación para mejor aprovechamiento (2002) Congreso de la República. Perú.

Regodón J.A. (1997) Obtención y caracterización de cepas autóctonas de levaduras para la elaboración estandarizada de vinos de calidad. Tesis Doctoral, Universidad de Extremadura, España.

Regondón, J.A., Pérez, F., Valdés, M.E., De Migue, C. And Ramírez, M. (1997) A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. *Food Microbiology* **14**, 247-354

Redzepovic S., Orlic S., Sikora S., Majdak A. and Petrorius I.S. (2002) Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian vineyards. *Letter in Applied Microbiology* **35**, 305-310

Ribéreau-Gayon, P. (1985) New developments in wine microbiology. *Am. J. Enol. Vitic.* **36**, 1-10.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donéche B., and Lonvaud A. (2006) Cytology, Taxonomy and Ecology of Grape and Wine Yeasts. *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications* **1**, 1-52.

Rodríguez L.A., Abad, D., Gomez, J, Casanova, J.B. y Lema, C. (1998) Fenotipo Killer: Distribución en las comarcas de la Ribeira Sacra en las poblaciones de *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technology* **2**(1), 33-37

Romano P. and Suzzi G. (1993) Higher alcohol and acetoin production by *Zygosaccharomyces* wines yeast. *Journal of Applied Bacteriology* **75**, 541-545.

Sangorrín M.P., Zajonskovsky I.E., Lopes C.A., Rodríguez M.. Giraudo de van Broock (2001) Killer behaviour in wild wine yeast associated with Merlot and Malbec type must spontaneously fermented from Northwestern Patagonia (Argentina). *Journal Basic Microbiology* **2**, 105-113

Satora P. and Tuszunski T. (2005) Biodiversity of yeasts during plum Wegierka Zwyczajna spontaneous fermentation. *Food Technol. Biotechnology* **43**, 277-282

Shane Gold R., Meagher M M., Hutkins R. and Conway T. (1992) Ethanol tolerance and carbohydrate metabolism in lactobacilli. *Journal of Industrial Microbiology* **10**, 45-54.

Schutz M., Gafner J. (1993) Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *Journal of Applied Bacteriology* **75**, 551-558

Soares G., Sato H. (2000) Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L Killer toxin. *Brazilian Journal of Microbiology*. **31**, 291-297

Suárez J.A.; Iñigo B. (1992) “Microbiología enológica. Fundamentos en vinificación”. Ediciones Mundi Prensa, Madrid.

Torija M.J. (2002) Ecología de levaduras: selección y adaptación a fermentaciones vínicas. Tesis doctoral, Univesitat Rovira I Virgili, Tarragona, España.

Torriani S., Zapparoli G. and Suzzi G. (1999) Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces sensu stricto* strains isolated from Amarone wine. *Antonie van Leeuwenhoek* **75**, 207–215, 1999.

Ubeda J.F., Briones A.I. and Izquierdo P.M. (1998) Study of the oenological characteristics and enzymatic activities of wine yeasts. *Food microbiology* **15**, 399-406

Valente P., Ramos J.P. and Leoncini O. (1999) Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. *Canadian Journal of Microbiology*. **45**, 949-958

Vazquez F., Figueroa L. y Toro M.E. (2000) Food Microbiology Protocols. Chapter: Selection of wine yeast by means of oenological characteristics. Edited by Spencer and Raogut de Spenser Humana Press - Totowa, New Jersey

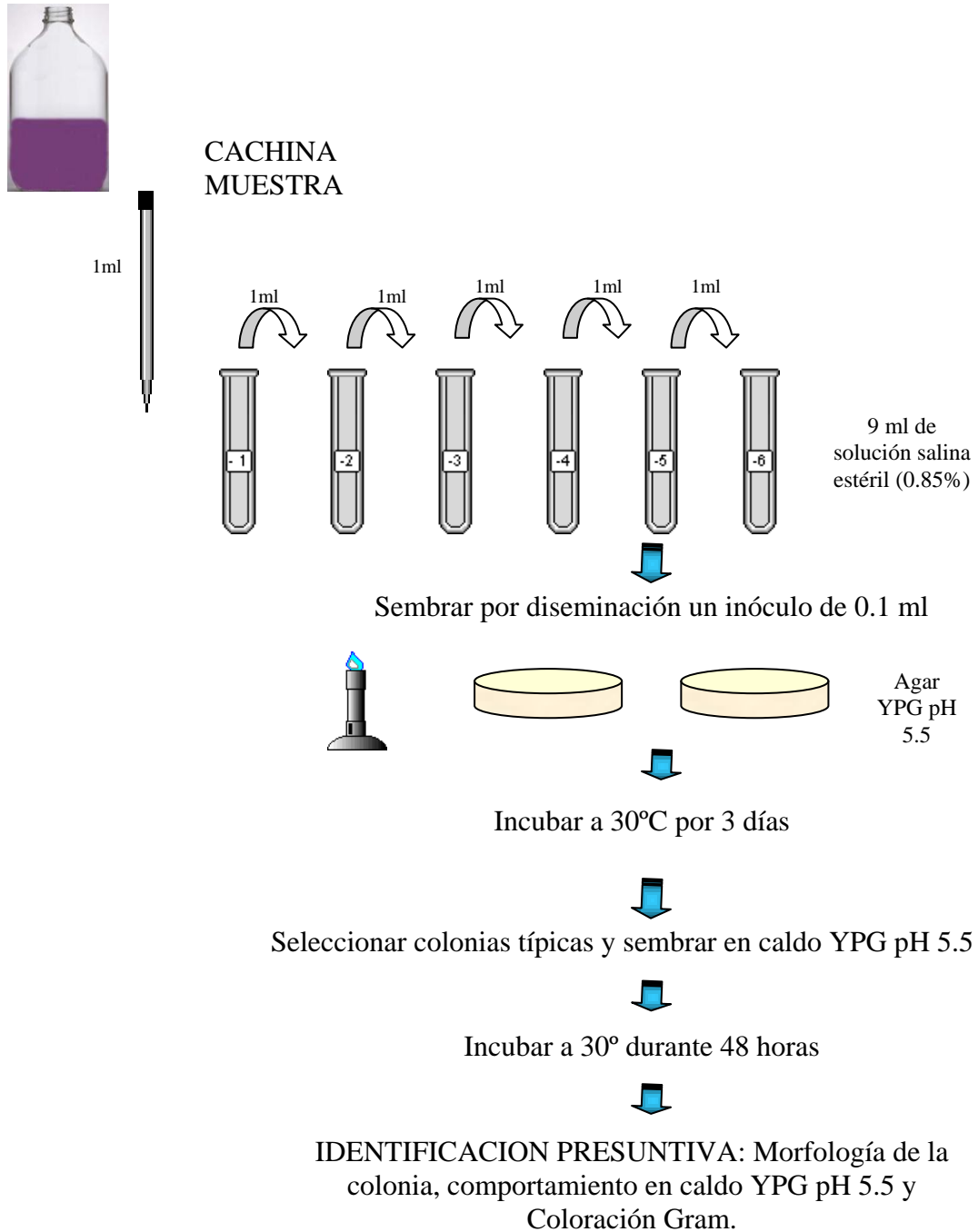
Wickermann, L.J. (1951) Taxonomy of yeast U.S. Department of Agriculture Technical Bull. 1029 U.S. Department of Agriculture. Washington. D.C.

Zagorc T., Maráz A., Cadez N., Povhe Jemec K., Péter G., Resnik M., Nemanic J. and Raspor P. (2001) Indigenous wine killer yeast and their application as a starter culture in wine fermentation. *Food Microbiology*. **18**, 441-451

ANEXO A

PROTOCOLOS

PROTOCOLO 1: AISLAMIENTO DE LEVADURAS NATIVAS ASOCIADAS A CHACHINA DE LUNAHUANÁ



PROTOCOLO 2: TOLERANCIA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETANOL DE LEVADURAS DE CACHINA

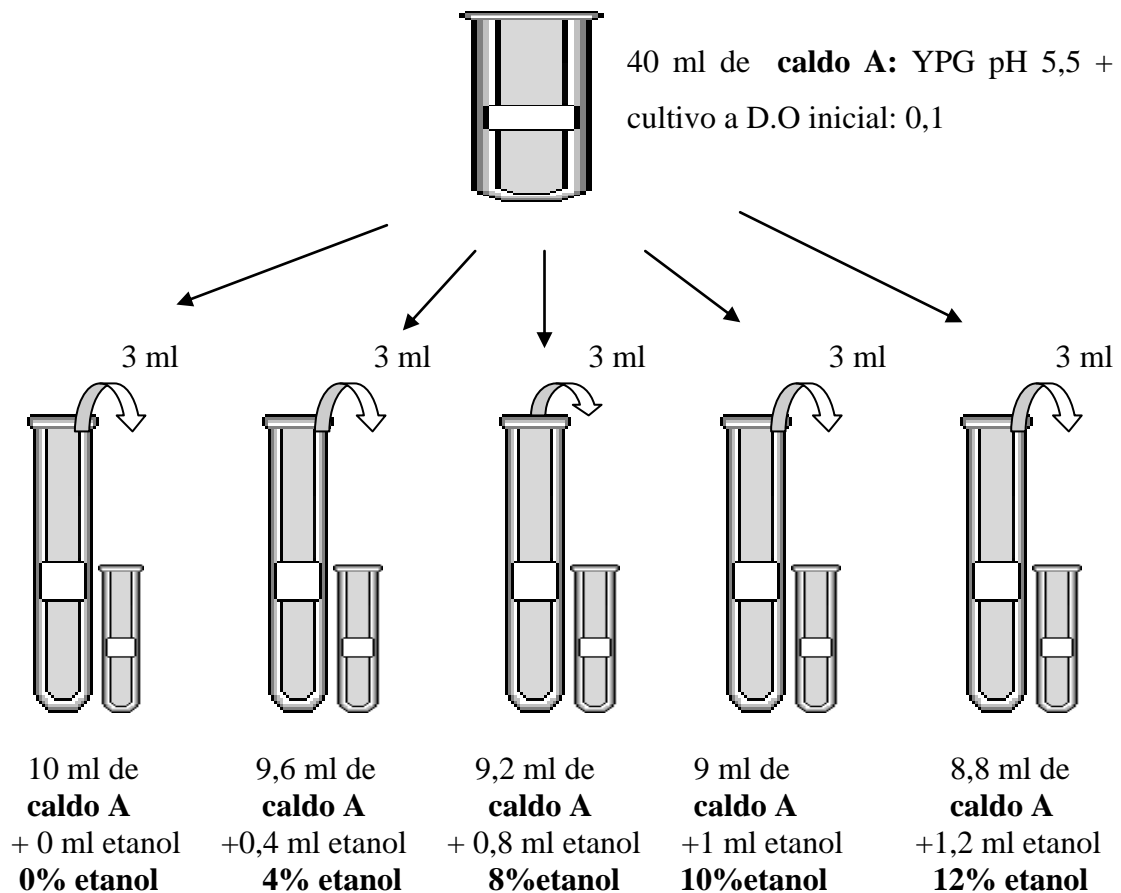
DIA 1: Reactivar el cultivo de levadura a partir de su cepario a un caldo YPG pH 5.5

DIA 2: Observar el crecimiento y realizar el primer pasaje a un caldo YPG pH 5.5

DIA 3: Registrar el crecimiento a las 24 horas y realizar el segundo pasaje a un caldo YPG pH 5.5

DIA 4:

- Transferir 1-2 ml de cultivo activo hacia un frasco con 40 ml de caldo YPG pH 5,5. Homogenizar y verter aproximadamente 2,5 ml del frasco grande a un tubo Y medir la D.O. a 595 nm hasta obtener una DO. inicial de 0,1
- El tubo de ensayo Blanco: tubo con caldo YPG pH 5.5 con determinada concentración de etanol (0, 4, 8, 10, 12%) sin adición de cultivo microbiano



Incubar a 30°C en microaerofilia los tubos de ensayo con 3 ml de caldo y cultivo a diferentes concentraciones de etanol, medir la D.O 595 nm cada 4 horas

PROTOCOLO 3: TOLERANCIA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLUCOSA DE LEVADURAS DE CACHINA

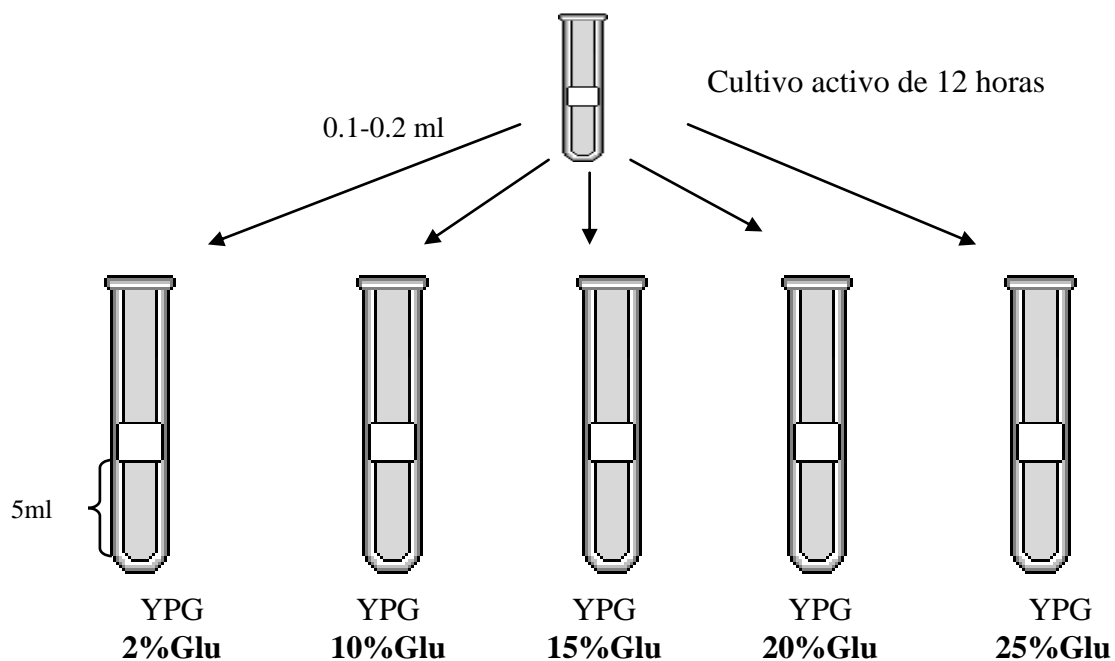
DIA 1: Reactivar el cultivo de levadura a partir de su cepario a un caldo YPG pH 5.5

DIA 2: Observar el crecimiento y realizar el primer pasaje a un caldo YPG pH 5.5

DIA 3: Registrar el crecimiento a las 24 horas y realizar el segundo pasaje a un caldo YPG pH 5.5

DIA 4:

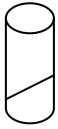
- Transferir 0.1-0.2 ml de cultivo activo hacia un Tubo con 5 ml de caldo YPG pH 5,5 con una concentración determinada de azúcar glucosa (2, 10, 12, 20, 25%). Homogenizar y medir la D.O. a 540 nm hasta obtener una D.O. inicial de 0,1
- Si la D.O es menos que 0.1, agregar cultivo, de lo contrario agregar mas medio líquido con la adecuada concentración de azúcar para cada prueba.
- Blancos: tubos con caldo YPG pH 5.5 cada uno a una concentración de azúcar diferentes (2, 10, 12, 20, 25%).



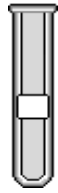
Incubar a 30°C en microaerofilia los tubos con caldo y cultivo a diferentes concentraciones de glucosa, medir la D.O 540 nm cada 4 horas. Es tolerante si registra $D.O > 1.0$

PROTOCOLO 4: DETECCION DE LEVADURAS CON FENOTIPO KILLER

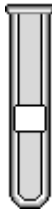
A



A partir de un cepario sólido inocular el cultivo a un caldo líquido YPG pH 5.5



Incubar a 30 °C por 24 horas.



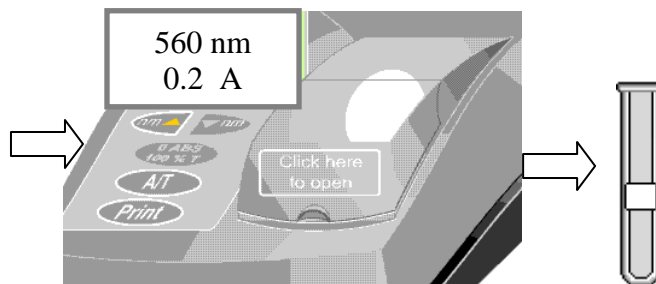
Realizar pasaje de 24 horas de crecimiento.



Obtener cultivos activos de 24 horas. Posibles productoras (**A**)

B

Agregar cultivo a un nuevo caldo YPG pH 5.5 y medir la D.O. = 0.2 (560 nm)

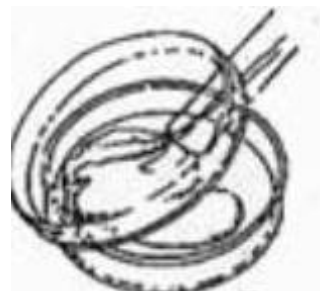


Cultivo Indicador (**B**)

A partir de cultivos de cepas indicadoras (**B**) con D.O. 0.2, agregar 0.1 ml a una placa estéril y añadir 15 ml de A.Y.E.P.D. + M.B. 1% fundido y atemperado a 40-45°C



Agitar adecuadamente y dejar solidificar por 30 minutos. A partir de los cultivos activos posibles productoras (**A**), motear los cultivos en el césped del agar con su respectivo rotulo.



PROTOCOLO 5: RESISTENCIA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ANHIDRIDO SULFUROSO DE LEVADURAS DE CACHINA

Medio de inoculación para la prueba de resistencia a SO₂:

- Yeast nitrogen base 6.7 g/L
- Glucosa 10 g/L

El medio esterilizado por filtración es ajustado a pH 3.5-4.0

Medio para la resistencia a SO₂: en g/L: YNB 6.7; Glucosa 10.

- Se divide en 3 lotes y metabisulfito de potasio es añadido logrando concentraciones totales de SO₂ de 100, 200 y 300 mg/l. El medio se reparte en tubos de ensayo a razón de 5 ml y se inocula las cepas en estudio (D.O. 0.1 medido a longitud de onda de 590nm). Se incuban a 25-30°C. El crecimiento se evalúa por medida de la densidad óptica del cultivo a 590 nm durante los primeros 3 de incubación.

ANEXO B

MEDIOS DE CULTIVOS

A. MEDIOS DE CULTIVOS:

1. AGAR YPG (Yeast Extracte Pectone Dextrose)

Extracto de Levadura	5.0 gr/L
Peptona de carne.....	10.0 gr/L
Glucosa.....	20.0 gr/L
Agar	18.0 gr/L

- Ajustar el pH a 5.5
- Esterilizar por 15 minutos a 121°C
- Para el aislamiento de Levaduras.

2. YEPD líquido

La misma composición que el medio anterior, pero sin agar.

3. AGAR PLATE COUNT

Extracto de Levadura.....	2,5 gr/L
D(+)-Glucosa.....	1,0 gr/L
Triptona.....	5,0 gr/L
Agar.....	20 gr/L
pH: 7,0±0,2-	

4. AGAR MAC – CONKEY

Peptona de caseína.....	17.0 gr/L
Peptona de Carne.....	3.0 gr/L
NaCl.....	5.0 gr/L
Lactosa	10.0 gr/L
Mezcla de Sales Biliares.....	1.5 gr/L
Rojo Neutro	0.03 gr/L
Violeta Cristal	0.001 gr/L
Agar – Agar....	13.5

- Ajustar el pH a 7.0
- Esterilizar por 15 minutos a 121°C

5. CALDO DE FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS PARA LEVADURAS

Peptona de Carne.....	5.0 gr
NaCl	2.5 gr
NaOH 1N.....	0.5 ml
Agua destilada	1000 ml

+ 50 ml del Indicador Púrpura de Bromocresol
+ Carbohidratos al 1 % o 2 % (Glucosa, Galactosa, Lactosa, Maltosa, Rafinosa, Sacarosa)

- Ajustar el pH a 7.0
- Esterilizar por 15 minutos a 121°C

6. CALDO MYPG (Medio de Pre-esporulacion para Levaduras)

Extracto de malta	0.3 %
Glucosa	2.0 %
Extracto de Levadura.....	0.3 %
Peptona.....	0.5 %
K ₂ HPO ₄ (fosfato monopotásico).....	0.1 %

Ajustar pH a 5.5

7. AGAR ACETATO

Acetato de Potasio	1%
Extracto de Levadura.....	0.25%
Glucosa.	0.1%
Agar	1.8%

pH 7.5- 8.0

- Licuar el medio
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos.
- Colocar los tubos es plano inclinado

8. AGAR ALMIDON DE ARROZ

Arroz.....	4 %
Agar.....	1.8 a 2.0 %

- El arroz se hierve durante 60 minutos.
- Luego se filtra (gasa y algodón)
- Regular el pH 6.0
- Se agrega el agar y se completa el volumen con H₂O destilada
- Autoclavar a 121°C x 10 minutos.
- Colocar 3ml de medio en laminas ubicadas dentro de la placa petri.

9. MEDIO YEPD-MB (Según Sangorrín M.)

Extracto de levadura.....	0.3 %
Extracto de malta.....	0.3%
Peptona de carne.....	0.5%
Glucosa.....	1%
NaCl.....	1%
Azul de metileno.....	0.003%

- El medio debe estar tamponado a pH 4.5 con ácido cítrico 0.1M y bifosfato potásico 0.2M.

B. REACTIVOS:

1. INDICADOR PÚRPURA DE BROMOCRESOL

Púrpura de Bromocresol	0.04 gr
Agua destilada	1000 ml
NaOH 1N.....	1 gota

pH = 7.0

*Dejar 24 a 48 horas antes de su uso

2. AZUL DE METILENO

Azul de metileno.....	0.3 gr.
Etanol al 95 %.....	30.0 ml
Agua destilada.....	100.0 ml

3. Coloración Ácido Resistente de Kinyon (Modificado)

I Solución de Carbol Fucsina:

Fucsina básica = 4gr.

Alcohol etílico = 20. 0 ml.

(Remover el tinte con alcohol y dejar guardando por 24 horas)

Luego añadir :

Fenol = 8 ml

Agua destilada = 100 ml

II Agente decolorante

H₂SO₄ acuoso al 1 %

III Solución de Azul Metileno

- Azul de Metileno = 0.3 gr.
- Alcohol etílico al 95%

Procedimiento para colorear

- 1.-** Hacer frotis a partir de los cultivos y dejar secar
- 2.- Inundar la lámina con carbol fucsina de Kinyon por 20 minutos a T ° ambiente.
- 3.- Lavar con H₂O destilada
- 4.- Lavar con alcohol etílico al 50% hasta eliminar todo exceso del colorante
- 5.- Lavar con H₂O destilada
- 6.- Lavar con H₂SO₄ acuoso por 3 minutos
- 7.- Contrastar con azul de metileno por 5 minutos
- 8.- Lavar con H₂O destilada, secar, examinar a inmersión